

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS



Expresión de la Aromatasa P450
en los prolactinomas y su relación
con la proliferación celular y apoptosis

JOSÉ MANUEL LARRÍNAGA MENDIZÁBAL

2009

RICARDO VÁZQUEZ RODRÍGUEZ, Catedrático de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, **MANUEL RUBIO SÁNCHEZ**, Profesor Titular de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y **JOSÉ CARRETERO GONZÁLEZ**, Catedrático de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, en su calidad de Directores del Trabajo de Tesis Doctoral

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado «Expresión de la Aromatasa P450 en los prolactinomas y su relación con la proliferación celular y la apoptosis» ha sido realizado bajo nuestra dirección por Don José Manuel Larrínaga Mendizábal en los Laboratorios de Neuroendocrinología del Departamento de Anatomía e Histología Humanas, integrados en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL)

Que a nuestro entender, el trabajo reúne los requisitos suficientes de experimentalidad, originalidad e interés científico y aplicativo como para ser presentado y defendido como trabajo de Tesis Doctoral

Y para que así conste firmamos la presente en Salamanca a 14 de abril, 2009

Ricardo Vázquez

Manuel Rubio

José Carretero

Indice

<i>Prólogo</i>	8
INTRODUCCIÓN	14
CICLO CELULAR.....	18
<i>Control intracelular</i>	20
<i>Control extracelular</i>	22
PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS.....	22
AROMATASA HIPOFISARIA.....	32
PROLACTINOMAS.....	38
PLANTEAMIENTO	44
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	52
OBJETIVOS	53
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	54
MATERIAL Y METODOS	55
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	56
PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	57
INCLUSIÓN EN PARAFINA.....	57
PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	58
INMUNOCITOQUÍMICA.....	58
ANTICUERPOS EMPLEADOS.....	59
PROCESADO INMUNOCITOQUÍMICO.....	60

CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES.....	61
TRATAMIENTO DE LOS TEXTOS Y FIGURAS. EDICIÓN FINAL.....	61
RESULTADOS	62
PROLACTINOMAS HUMANOS.....	64
PROLACTINOMAS Y AROMATASA P450.....	66
PROLIFERACIÓN CELULAR. MARCAJE CON PCNA.....	68
PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR. MARCAJE DE LA PROTEÍNA p27.....	71
APOPTOSIS. MARCAJE CON CASPASA 3 ACTIVA.....	73
APOPTOSIS. MARCAJE PARA BCL-2.....	75
CORRELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS MARCADORES, EN LOS PROLACTINOMAS HUMANOS..	77
<i>Correlación PCNA y p27</i>	77
<i>Correlación PCNA y caspasa 3 activa</i>	77
<i>Correlación PCNA y Bcl-2</i>	78
<i>Correlación caspasa 3 y p27</i>	78
<i>Correlación caspasa 3 y Bcl-2</i>	78
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	100
BIBLIOGRAFÍA	103

Como quiera que no se puede ser universal y saber todo lo que se puede llegar a conocer acerca de la totalidad, es preciso limitarse a saber un poco de todo. Además, es mucho más hermoso saber algo de todo que saberlo todo de una cosa.

(Pascal)

A mis padres, que me dieron la vida física y ética

*A la Universidad de Salamanca, donde aprendí a
estimar el estudio y conocimiento*

*A mi esposa, por su apoyo incondicional y
constante*

PRÓLOGO

La palabra prólogo, según la segunda acepción de la RAE, es aquello que sirve como de exordio o principio para iniciar una cosa.

En este trabajo que les presento, el exordio es justificar el motivo del mismo.

Finalizados los estudios y conseguida la licenciatura en la Facultad de Medicina de Salamanca en el año 1962, los imperativos de la vida me condicionaron a trabajar en distintos Hospitales. Escogí la especialidad de Ginecología porque entonces era la única asequible y, como le dije al director del Hospital de San Sebastián, D. Carlos Elósegui, *he estudiado todas las asignaturas y no sé nada de ninguna, pero a la Especialidad que usted me asigne, me dedicaré con todo mi interés.*

Y así ha sido. Durante más de cuatro décadas he practicado la ginecología en todas sus facetas. Desde la Obstetricia hasta la Ginecología total, con su patología orgánica y funcional, patología del suelo pélvico, esterilidad, contracepción, oncología llamada ginecológica y desde comienzos del ejercicio profesional, con la patología mamaria benigna y maligna; hago esta observación porque la patología de la mama, sobre todo la oncológica, era

atribución de los cirujanos. Poco a poco fue pasando a nuestro «territorio» y, aunque aún se comparte ese campo con los cirujanos, ya está incluida en todos los Departamentos de Ginecología.

Con el extraordinario progreso que ha experimentado la compartimentación de la especialidad, en la ecografía, contracepción, fecundación asistida, oncología (en muchos Centros aún más subdivida: de Ovarios, Cérvix, Endometrio y Mama) era más difícil y complicado estar «a la última», aunque lo procuraba, sabedor de que quienes se dedicaban exclusivamente a uno de los temas, sabían más que yo del mismo. Eso me obligaba a reciclarme periódicamente en esos campos. Yo no había tenido oportunidad de polarizarme, pero si hubiera podido elegir entre la Ginecología global que he practicado o la polarizada monotemática, habría elegido la primera.

Solo me quedaba obtener el título de Doctor. Esa ha sido mi asignatura pendiente y que jamás me abandonaba la «obligación» de aprobarla.

Ahora que he cesado en la actividad profesional pública y privada no tenía ninguna disculpa para no intentar hacerlo. En realidad nunca hay verdaderas disculpas para justificar lo no realizado. Merced a la amistad adquirida con los compañeros de estudios y mantenida durante los años posteriores, principalmente con los Profesores Agustín Martín Pascual y Ricardo Vázquez Rodríguez, busqué una última oportunidad.

En Ginecología, la hipófisis ha sido siempre la piedra básica del conocimiento de la Fisiología y Patología femenina. Entre las hormonas que produce, una de las que más problemas o interés nos suscitaba y sigue haciéndolo, es la Prolactina.

Por la década de los 60 del pasado siglo los desafíos diagnósticos de las alteraciones hipofisarias tratábamos de resolverlos con la radiografía de la silla turca.

Si hallábamos una alteración clara de la «silla de montar» y se acompañaba de alteraciones de la visión por deterioro del quiasma óptico, el diagnóstico estaba claro. En los demás casos nos quedábamos... «a dos velas».

Posteriormente fuimos ahondando en el conocimiento de la fisiopatología femenina descubriendo la influencia de la Prolactina en las alteraciones del ciclo menstrual, esterilidad, galactorreas...

También quiero recordar los «hallazgos» clínicos de los ginecólogos en la época de los psicofármacos que alteraban la prolactina y sus cuadros de amenorrea-galactorrea; el sulpiride, con su fármaco estrella: Dogmatil. Costó asociarlo, pero una vez corroborado se estudió y comprobó que otros psicofármacos también producían trastornos similares, aunque con menos frecuencia.

Con las nuevas tecnologías de diagnóstico por imagen (TAC, RMN) ahora diagnosticamos microtumores y con los métodos de laboratorio actuales podemos determinar con gran precisión los niveles de prolactina en sangre.

También hemos llegado a conocer donde tiene su expresión génica: En las células lactotropas de la adenohipófisis, en el endometrio decidualizado y en el miometrio. La prolactina secretada en estos distintos lugares es idéntica, pero hay diferencias en el ARNm que indican disparidades en la regulación génica.

Como «último» estudio clínico, más bien anecdótico, revela que la excitación sexual y el orgasmo en los varones y las mujeres producen notables ele-

vaciones de las concentraciones circulantes de prolactina que persisten al menos 1 hora, lo que tal vez contribuya a la supresión de la sexualidad inmediatamente después de la excitación y orgasmo.

Tratando de mostrar mi interés por la prolactina, quizá haya sido prolijo, y les ruego me disculpen por ello, por lo que ahora me centro en el trabajo que les presento.

Los 100 billones de células del organismo forman parte de una comunidad bien organizada en la que el número total de células está regulado, no sólo por el control de la división celular, sino también por el control de la velocidad de la muerte celular. Cuando las células ya no se necesitan, o cuando se convierten en una amenaza para el organismo, sufren una muerte celular programada, suicida o apoptosis. Este proceso implica una cascada proteolítica que hace que la célula se encoja y condense para desmontar su citoesqueleto y alterar su superficie de tal forma que una célula fagocítica cercana, como un macrófago, se pueda unir a la membrana celular y digerir la célula.

Por el contrario, las células que mueren por lesión aguda se hinchan y estallan debido a la pérdida de integridad de la membrana celular, lo cual se denomina *necrosis* celular y estas células necróticas vierten su contenido haciendo que la inflamación y la lesión se extienda a las células vecinas.

La apoptosis es una muerte metódica que da lugar al desmontaje y fagocitosis de la célula antes de que se vierta su contenido, por lo que las células vecinas se mantienen sanas.

La iniciación de la apoptosis se efectúa mediante la activación de una familia de proteasas conocidas como caspasas.

Nos centraremos en lo que es el objeto de trabajo: Las alteraciones o controles que podemos efectuar en estos procesos, que son generales, que suceden a nivel de hipófisis, en su vertiente productora de Prolactina.

A mis amigos Ricardo Vázquez Rodríguez y Agustín Martín Pascual, que si se lo dijera personalmente, creo que hasta se molestarían.

A los Profesores y Catedráticos de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, en su calidad de Directores del Trabajo de Tesis Doctoral, Manuel Rubio Sánchez y José Carretero González y demás colaboradores de su equipo, mi más profundo y sincero agradecimiento por su labor desinteresada y entusiasta, sin la cual no podría haber llegado hasta aquí. Jamás lo olvidaré y ¡ojalá! pudiera emularos.

Introducción

La hipófisis o glándula pituitaria es una glándula de secreción interna, de pequeño tamaño, situada en la cara inferior del cerebro, por detrás del quiasma óptico y debajo del hipotálamo, al que se encuentra unida a través del tallo infundibular (Testut y Latarjet, 1979; Gray's, 2005; Moore y Dalley, 2007).

Está alojada en la silla turca del esfenoides y en ella se diferencian varias partes; según la clasificación, aceptada hace más de 60 años, que hicieron Rioch y col (1940) se diferencian en ella, un lóbulo anterior o adenohipófisis, subdividida en tres partes (pars distalis, pars tuberalis y pars intermedia) y un lóbulo posterior, que engloba la neurohipófisis o lóbulo neural, conectada con el infundíbulo o eminencia media a través del tallo neural o infundibular.

En el humano no existe pars intermedia y aquellas células que corresponderían a esta porción, están situadas en la pars distalis de la adenohipófisis.

Al diferenciarse en ella dos partes, encontramos también dos tejidos endocrinos totalmente diferentes; uno, el formado por las células endocrinas de la adenohipófisis, que secretan las hormonas adenohipofisarias y otro, el constituido por los axones de las neuronas magnocelulares de núcleos hipotalámicos, junto a células de estirpe glial, los pituicitos, que forman parte de la

neurohipófisis y donde se eliminan las hormonas vasopresina y oxitocina (Morris, 2008).

La adenohipófisis posee una serie de células que secretan diversas hormonas que actúan sobre distintas estructuras, consideradas como órganos diana. De acuerdo con Benarroch y col. (2008) y Morris (2008) estas células y las hormonas son: célula tirotrona que secreta la hormona tirotrona o TSH, corticotropa que elabora la hormona adrenocorticotropa o ACTH y otros productos derivados de la proopiomelanocortina, gonadotropas que secretan las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), célula somatotropa, productora de la hormona somatotropa (STH o GH) y la célula lactotropa que secreta la prolactina (PRL).

Las funciones de la glándula pituitaria, a través de sus hormonas son, en conjunto, de gran valor e interés dentro del sistema endocrino; su importancia empezó a ponerse de manifiesto muy a finales del siglo XIX y continuó durante la primera mitad del siglo XX, llegándose a considerar a la hipófisis y concretamente a la adenohipófisis, como el «líder de la orquesta del sistema endocrino» (Kaplan, 2007).

En la segunda mitad del siglo XX se demostró que estímulos controlados por el hipotálamo influían en las distintas funciones hipofisarias, por lo que el papel de esta glándula estaba en parte condicionado por el hipotálamo, si bien, se siguió considerando a la hipófisis como líder del sistema endocrino, aunque con influencia hipotalámica.

Los avances en el siglo pasado fueron constantes. Desde un punto de vista morfológico, se puede afirmar que: se llegaron a caracterizar, a lo largo del tiempo, los distintos tipos celulares hipofisarios; baste decir en esta Introducción que con técnicas morfológicas, como la hematoxilina eosina (Schonemann, 1892), pasando por técnicas tetracrómicas (Herlant, 1964), se dio un impulso

notable al conocimiento de la citología hipofisaria; después, la microscopia electrónica caracterizó con toda precisión los diversos tipos celulares de la hipófisis, aunque quedaban algunas incógnitas por resolver; posteriormente, técnicas como la inmunocitoquímica han servido para identificar con toda claridad la citología hipofisaria de acuerdo con su función hormonal, permitiendo claramente la identificación de los diversos tipos celulares.

Desde un punto de vista funcional, a lo largo del siglo XX se fueron caracterizando sus diferentes hormonas, siendo la primera hormona aislada, la prolactina por Riddell en 1933, hecho publicado en la Revista American Journal of Physiology.

Hoy día se puede afirmar que la adenohipófisis posee una clara plasticidad y que hay numerosos estímulos, tanto intrínsecos como extrínsecos, que dan lugar a fenómenos de hipo e hiperplasia y que en determinadas circunstancias provocan tumores de las diversas células hipofisarias, los adenomas, dentro de los cuales, los más abundantes son los prolactinomas.

Se admite que las hormonas y los factores de crecimiento pueden intervenir en el desarrollo de los adenomas hipofisarios, al intervenir en el equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis. De acuerdo con Oishi y col (1993) la aparición de un tumor guarda relación con los procesos de proliferación celular, con todos los fenómenos que acontecen en el ciclo celular y con los procesos de apoptosis dentro de la glándula.

Un aumento de la proliferación conlleva un incremento de probabilidad de mutaciones que afectan a los protooncogenes y genes supresores de tumores; además, realza la progresión y la producción de metástasis (Renehan, 2008).

Por ello y en relación con el trabajo que vamos a desarrollar, cuyo objetivo es relacionar la expresión de la aromatasa P450 en prolactinomas huma-

nos con la proliferación y apoptosis, se pretende profundizar en el estudio de la génesis de estos tumores y, como base, en esta Introducción analizaremos: el ciclo celular, la proliferación y apoptosis, la aromatasa P450 y haremos alguna consideración sobre los prolactinomas.

CICLO CELULAR

El ciclo celular comprende una serie de eventos, finamente controlados, que conducen a la replicación del DNA y a la división celular.

Para la reproducción de los organismos, todas las células se originan, únicamente, de otra existente en ese momento. Su función es originar nuevas células, haciéndolo siempre mediante un proceso ordenado y repetitivo en el tiempo, de forma conveniente y con una regulación adecuada (Lewin, 2000).

En los organismos unicelulares la división celular implica una verdadera reproducción, ya que se generan dos células hijas que maduran y se transforman en dos seres distintos; sin embargo, en los organismos multicelulares, se requieren muchas divisiones celulares para formar un nuevo individuo y también para reemplazar nuevas células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o muerte celular (Aguirre, 2000).

Para que una célula se divida tienen que darse dos procesos alternativos, la duplicación de su genoma (fase S) y la realización de la mitosis (fase M). El período entre las fases M y S se denomina G1 y el período entre S y M se denomina G2. De este modo el ciclo celular se divide en cuatro fases (ver figura, página siguiente); una primera *fase G1* de crecimiento celular y actividad metabólica para preparar a los cromosoma para su replicación y que suele ser la fase mas larga; una *fase S* de síntesis del DNA y duplicación del centrosoma; una *fase G2* en la que la célula continua creciendo y se prepara para la divi-

Todos los procesos que tienen lugar durante el ciclo llevan un orden y supervisión muy estricta. Señales extra e intracelulares se encargan de llevar a cabo esta regulación. Las moléculas que regulan el ciclo celular son universales y se han mantenido durante la evolución, existiendo diversas proteínas que regulan la entrada en el ciclo y su continua progresión en cada fase (Ivanchuk y Rutka, 2004; DeWolf y Gastón, 2004; Burgués-Gasi6n y col, 2005).

Control intracelular

Se lleva a cabo a trav6s de prote6nas que activan o inhiben el ciclo, permitiendo su progreso o inhibi6ndolo. Permiten el progreso del ciclo los complejos *cdk-ciclina* y lo inhiben, dos familias de prote6nas, las *CIP* y las *INK4*.

Los complejos *cdk-ciclinas* est6n formados por dos tipos de prote6nas. Las *Kinasas dependientes de ciclinas* o *cdks*, cuyos niveles se mantienen relativamente constantes durante todo el ciclo celular y las *ciclinas* que, por el contrario, se sintetizan y degradan seg6n las distintas fases del ciclo celular.

Se conocen seis *cdks*, aunque s6lo se ha caracterizado la funci6n de cuatro de ellas (*cdk 1,2,4* y *6*) y de las *ciclinas* solo se conocen otras cuatro (*ciclinas A, B, D* y *E*). Las *cdks* fosforilan amino6cidos espec6ficos de algunas prote6nas, pero s6lo si est6 unida a una ciclina, conoci6ndose seis distintas combinaciones de *cdk-ciclina*, que act6an en diversas fases del ciclo.

Tambi6n es conocido que las c6lulas sintetizan prote6nas inhibidoras de los complejos *cdk-ciclinas*, interviniendo en el ciclo celular; han sido agrupadas en dos: las prote6nas *INK4* y las *CIP* o *prote6nas que inhiben las cdks*. Entre estas 6ltimas est6n, por interesarnos alguna de ellas en nuestro trabajo, la *p21*, *p27* y *p53*. Intervienen en impedir la proliferaci6n celular y los genes que codifican estas prote6nas se les denomina *genes supresores de tumores*.

Existen cuatro puntos para el control de la célula y del medio extracelular para que se produzca las fases del ciclo. De estos puntos, uno es de restricción y tres de control.

Los puntos de control son como estaciones en las que se controlan las características del medio y de la célula y se da como un *visto bueno* para poder *continuar el ciclo* o al contrario *para pararlo* o incluso *intentar reparar el daño*.

El primer punto de control se encuentra en G1, justo un poco después del punto de restricción que después veremos. Sus funciones son las de revisar como está el medio o si la célula ha crecido más o menos. Favorecen este control el complejo *cdk2-ciclina E* y lo inhiben los *CIP p53, p21 y p27*.

Después del primer punto de control, la célula pasa a fase S, pero en la misma, no existe ningún control como tal.

Al final de G2 se sitúa el segundo punto de control y consiste en comprobar si el material genético se ha duplicado correctamente, que no tenga errores y que el medio extracelular sea el adecuado. Los complejos *cdk1-ciclina A y B* intentan asegurar esta fase y los inhibidores son los anteriormente citados la *p53, p21 y p27*.

El tercer punto de control está en la fase M y se encarga de comprobar que todos los cromosomas se encuentran unidos al huso acromático.

Por último, el punto de restricción se encuentra casi al final de G1. Este punto está muy controlado por el medio y depende de él para que la célula siga o no con el ciclo. Los responsables intracelulares son los complejos *cdk4 y cdk6-ciclina D* que liberan el *factor de transcripción E2F* de la proteína del *retinoblastoma* o *proteína Rb*. El *E2F* estimula la síntesis de *cdk2* y *ciclina E* (necesarias para el paso de G1 a S y disminuye la concentración de *p27*).

Control extracelular

La célula no entra en el ciclo celular cuando ella quiere, si no cuando se activan los complejos cdk-ciclinas y ello se consigue por una serie de factores solubles, denominado mitógenos, que actúan sólo si el organismo necesita más células.

La mayoría de los mitógenos actúan en fase G1, liberando a la célula del control negativo del ciclo.

PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS

El número de células en un organismo está determinado por los niveles de proliferación (división, mitosis), crecimiento y diferenciación y muerte celulares (Raff, 1996).

El crecimiento, la muerte y la proliferación celulares son los procesos necesarios para que el organismo adquiera la forma y el tamaño característicos. La proliferación celular es fruto de un ciclo celular, perfectamente regulado, como hemos visto antes, por mediadores intra y extracelulares.

La hipófisis, órgano sobre el que recae nuestro estudio, ha sido considerada como un órgano quiescente, con muy escasa proliferación celular; durante muchos años se ha admitido, en general y por supuesto en la hipófisis, que en las células maduras, bien diferenciadas, su nivel de proliferación era escaso (Leblond y Walker, 1956). Referido a la adenohipófisis, este concepto ha sido revisado recientemente, se ha reconocido la existencia de plasticidad en la glándula (Denef, 2003; Takahashi, 2004) y por tanto, la existencia de proliferación.

En particular, en las células adenohipofisarias productoras de Prolactina o células lactotropas, la plasticidad se pone de manifiesto ante determinadas condiciones y estímulos que inducen proliferación (también apoptosis y diferenciación celular); en condiciones fisiológicas, como la lactación, gestación, se produce un aumento de la proliferación en este tipo celular, probablemente debido a niveles altos de estrógenos -E2- (Yin y Arita, 2000). También aumentan en el ciclo estrual, durante la fase de estro (Hunt, 1943; Hunt y Hunt, 1966; Crane y Loomes, 1967).

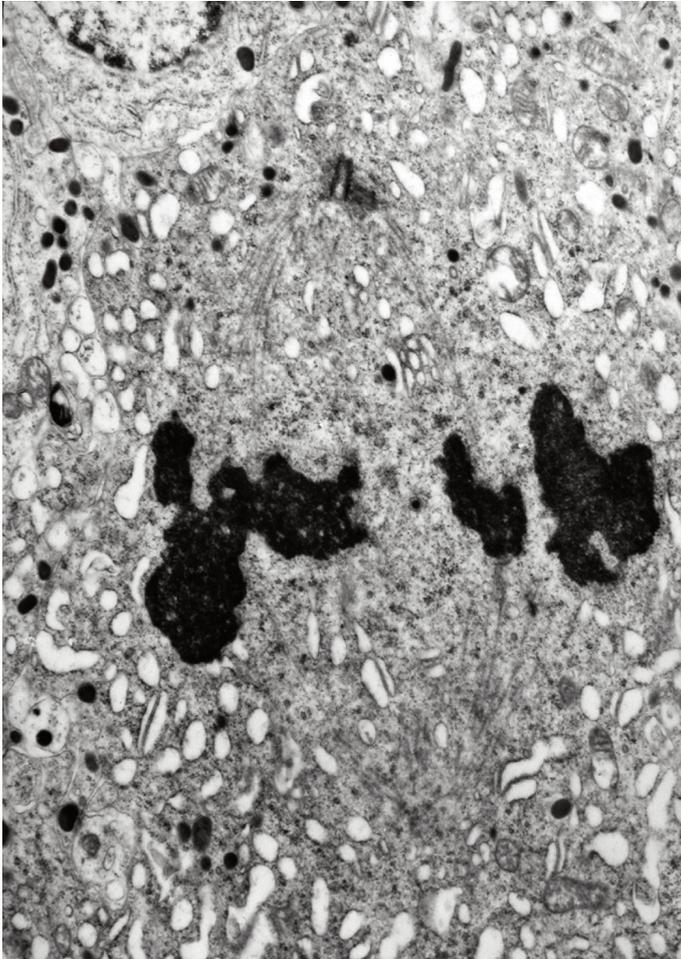
La renovación de las células adenohipofisarias de ratas hembras muestran características rítmicas en relación con el ciclo estrual. El pico de proliferación celular se localiza en el estro (Hashi y col., 1995) mientras que el máxima nivel de apoptosis se observa en proestro, cuando los niveles de E2 son mas altos (Yin y Arita, 2002).

Además, la plasticidad también se ha demostrado al comprobarse la conversión de células somatotropas en lactotropas durante la lactación (Porter y col., 1991) con incremento de las últimas, aunque, también hay evidencias de que se produce muerte celular por apoptosis, cuando hay aumento de la población lactotropa, hasta valores similares a los existente en condiciones de normalidad (Ahlbom y col., 1998).

Según Candolfi, la adenohipófisis mantiene, de forma constante, la renovación celular mediante los procesos de proliferación, crecimiento y diferenciación (Candolfi y col., 2006).

En general, el estudio de la proliferación de estas células glandulares hipofisarias se lleva realizando desde hace tiempo utilizando diversas técnicas; las primeras fueron la administración de colchicina y parada en metafase de las células. Mas tarde, se han utilizado otras técnicas como la timidina tri-

tiada, la Bromodexouridina (BrdU) o empleando el antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA), demostrando lo anteriormente expuesto.



Metafase en una célula hipofisaria madura. Se aprecia la cromatina dispuesta en el plano ecuatorial, los microtúbulos del huso acromático y uno de los centriolos.

El fenómeno de la muerte celular ha ido poniéndose de manifiesto paulatinamente desde hace 165 años (Vogt, 1842; Kerr y col.1972; Sulston y Horvitz, 1997).

Hasta hace poco tiempo se admitía que la muerte celular se debía a la «necrosis» de la célula, la cual se producía accidentalmente cuando se lesionaba por procesos químicos, biológicos o mecánicos letales. En este caso, las células y organelas se hinchan al perderse la capacidad de

control de iones y agua por la membrana celular, la célula se rompe y su contenido pasa al espacio intercelular lo que conlleva la inflamación de los tejidos próximos.

Sin embargo, existe otro tipo de muerte celular, la «apoptosis» o muerte inducida o programada, también conocida como suicidio celular. Se lleva a cabo mediante una coordinación de procesos biológicos dependientes de energía y controlado genéticamente (Cotter y col., 1990).

La muerte celular por apoptosis es una propiedad común de todos los organismos multicelulares (Krammer, 2000; Korsmeyer, 2004). El término fue acuñado por Currie y sus colaboradores (Kerr y col., 1972) para describir una determinada muerte celular observada en múltiples células y tejidos.

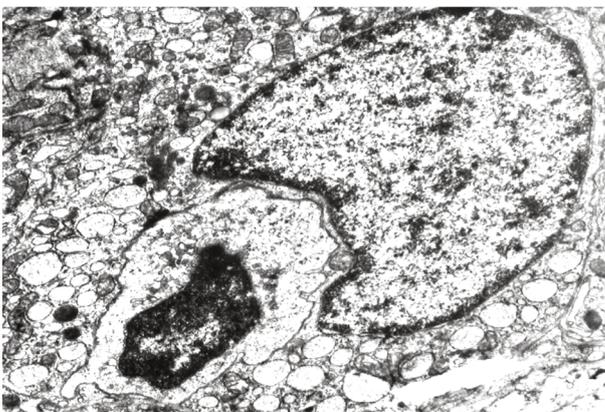
La apoptosis es un fenómeno que está precisamente regulado; estudios recientes han demostrado que el desencadenante de las alteraciones que se producen durante la apoptosis son debidas a cambios en la función mitocondrial de las células, junto a alteraciones energéticas, que causan disfunción celular (Smaili y col., 2000; Shosshan-Barmatz y col., 2006) aunque hoy día también se asocia la participación en este proceso del retículo endoplásmico rugoso (Hitomi y col.2004; Pattacini y col. 2004).

Las mitocondrias están involucradas en muchos de los procesos esenciales para la supervivencia celular (producción de energía, homeostasis del calcio y determinadas vías metabólicas) también lo están, en los mecanismos fisiológicos de la muerte por apoptosis. Las vías mitocondriales, están a menudo sujetas a alteraciones y, al parecer, intervienen en varias patologías como el cáncer (Strasser y col. 1990; McDonell y Korsmeyer, 1991) enfermedades autoinmunes (Strasser y col., 1991; Watanabe-Fukunaga y col., 1992) diabetes, obesidad, isquemia y enfermedades neurodegenerativas (Barr y Tmei, 1994; Thompson, 1995; Weissig y col., 2004).

Como antes se dijo, este tipo de muerte celular está sujeta a control genético (Ellis y Horvitz, 1986; Vaux y col., 1988; Cotter y col., 1990) habiéndose demostrado que anormalidades en su regulación es causa de alteraciones, como tumores (Strasser y col., 1990; McDonell y Korsmeyer, 1991) enfermedades autoinmunes (Strasser y col.1991; Watanabe-Fukunaga y col., 1992) y posiblemente, alteraciones degenerativas (Barr y Tmei, 1994; Thompson, 1995).

Puede ser desencadenada por un gran número de factores, entre los que se incluyen: radiaciones ultravioletas y radiaciones gamma, drogas utilizadas en quimioterapia y estrés oxidativo (Hitomi y col., 2004; Pattacini y col., 2004) o alteraciones en factores de crecimiento o en las señales que provocan cambios de receptores celulares y sus ligandos (Nagata, 1997; Ashkenazi y Dixit, 1998 y Krammer, 1998).

Su estudio se inició desde un punto de vista morfológico, analizando diferentes tejidos, fundamentalmente embrionarios, mediante técnicas de microscopía óptica (hematoxilina eosina) y después con microscopía electrónica.



Imágenes de dos células glandulares (tiroideas) fagocitando cuerpos apoptóticos.

En las células en apoptosis se han comprobado una serie de cambios morfológicos; las células se tornan más pequeñas y a microscopía electrónica, se aprecia una condensación de la cromatina nuclear en la superficie interna del núcleo; irregularidades en la forma celular y fragmentaciones tanto del núcleo como del citoplasma, iniciándose con protrusiones de la membrana a modo de ampollas y terminando con la formación de los cuerpos apoptóticos, que serán fagocitados por las células circundantes (Kerr y col., 1972; Wyllie y col., 1980).

Desde un punto de vista bioquímico se sabe que los procesos que concluyen con la muerte de la célula están concatenados, configurando la llamada «*cascada de la apoptosis*»; además en muchos de los pasos intervienen moléculas denominadas caspasas que también conforman la llamada «*cascada de las caspasas*» pues intervienen de forma jerárquica desde el inicio hasta el final de la apoptosis (Thornberry y Lazaenik, 1998; Cohen, 1997; Nicholson, 1999; Mandic y col, 2003; Sharma y Rohrer, 2004; Bente y col., 2006). Sin embargo, las moléculas que intervienen y las reacciones que se producen durante todo el proceso requieren de un primer paso seguido del siguiente para poder continuar y así sucesivamente, lo que da lugar a la cascada de la apoptosis. Ni mucho menos, todos los pasos están demasiado claros.

La cascada de la apoptosis se puede dividir en tres etapas; una primera corresponde al inicio de la cascada, con formación de «*caspasas iniciadoras*» del proceso de apoptosis (entre ellas, las caspasa 8, Fraser y Evan, 1996). Estas caspasas iniciadoras son las responsables de los primeros acontecimientos proteolíticos, como rotura de algunas proteínas del citoesqueleto, tipo vimentina y actina (esta proteólisis sería la responsable de las ampollas de la superficie celular (McCarthy y col., 1997) descrita morfológicamente.

La segunda etapa comprende la activación de las caspasas; las caspasas iniciadoras propician la aparición de las «*caspasas ejecutivas*» (Mignotte y Vayssiere, 1998) entre ellas, la caspasa 3 activa, dándose el inicio irreversible de la apoptosis o «*punto de no retorno*» en el proceso de la muerte celular.

El paso entre la primera y segunda etapa es finamente regulado por la familia de proteínas mitocondriales Bcl-2, que actúan como activadores o inhibidores en la producción de las caspasas ejecutivas (Hockenberry y col., 1990; Renvoize y col., 1997; Mignotte y Vayssiere, 1998).

Para que la apoptosis progrese, es decir, sea irreversible, es necesario que las caspasas ejecutivas (activas), por ejemplo, la caspasa 3 activa, actúen durante un cierto tiempo (Marks y col., 1998).

Estas caspasas activas, bien por ellas o bien por otras proteasas, rompen una amplia formación de proteínas necesarias para la supervivencia celular; incluye proteínas de filamento intermedio, proteínas de mantenimiento y de reparación de DNA.

Por último, la tercera etapa es la muerte celular, después de provocar una serie de alteraciones que conllevan, a la fragmentación del DNA y al colapso del núcleo y de la propia célula (Huppertz y col. (1999). Las caspasas activas actúan sobre el factor de fragmentación del DNA y otras endonucleasas, resultantes de la fragmentación del DNA.

Las caspasas son zimógenos, es decir, precursores enzimáticos inactivos, que requieren cambios bioquímicos para convertirse en enzimas; contienen un residuo de cisterna que es clave y cortan selectivamente proteínas en los sitios inmediatos a los residuos de aspartato, en dirección C-terminal.

En el hombre se han caracterizado 14 caspasas diferentes, aunque su número aumenta progresivamente; todas ellas se forman como procaspasas y, sólo cuando se activan, se transforman en verdaderas caspasas.

Teniendo en cuenta estos pasos, la actividad apoptótica ha sido estudiada en secciones de parafina, mediante el método de marcaje in situ del DNA fragmentado o técnica de TUNEL (Terminal dioxynucleótido transferasa-mediated dUTP nick-end labeling) detectando la apoptosis en estadios mas precoces que con la hematoxilina eosina.

Técnicas inmunocitoquímicas están siendo ampliamente utilizadas para analizar la expresión de determinadas proteínas reguladoras del proceso de apoptosis, como la presencia o no de caspasa 3 activa o las variaciones de la proteína Bcl-2, por citar aquellos marcadores por nosotros utilizados.

Kerr y col. (1972) y Wyllie y col. (1980) demostraron que durante la edad temprana de la apoptosis no se aprecian cambios en las mitocondrias, en el aparato de Golgi o en el retículo endoplásmico rugoso, aunque para otros, si que aparecen dilataciones en la membrana externa de las mitocondrias (Van-derHeiden y col 1997) así como la liberación de sustancias al espacio intermembrana mitocondrial.

En la cascada de la apoptosis, las mitocondrias se alteran y dejan salir al citoplasma, el citocromo c, (Kluck y col., 1997; Yang y col., 1997) y el factor que induce la apoptosis (Susin y col., 1999) y una distribución de la fosfatidil serina en las capas externa e interna de la membrana citoplásmica (Fadok y Henson, 1998; Strasser y col., 2000).

Esta fosfatidil serina, fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana, se expone en superficie y se une a receptores de las células fagocíticas para que estas fagociten a los cuerpos apoptóticos; a su vez, las células fagocíticas secretan citoquinas para inhibir la inflamación (Boticario y Cascales, 2008).

Además de las caspasas, en la regulación apoptótica se incluye la familia de proteínas Bcl-2. Esta familia incluye miembros proapoptóticos y antiapoptóticos; las proteínas antiapoptóticas contienen 4 dominios de Bcl-2 homólogos y entre ellas se encuentran las proteínas Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 y los proapoptóticos se integran en dos subgrupos; uno con dominios BH1, BH2, BH3 y otro, con numerosos dominios BH3 (Adams y Cory, 1998). Para una revisión

más amplia de esta familia de proteínas revisar el trabajo de Bouchier-Hayes y col (2005).

En condiciones basales se han observado apoptosis en diversos tipos celulares de la adenohipófisis, entre ellas, las células de prolactina o lactotropas (Nolan y col., 1998; Candolfi y col., 2002).

Durante el ciclo estrual, el nivel de apoptosis se incrementa en la tarde del proestro en este tipo celular (Yin y Arita, 2002). También, el nivel de apoptosis se correlaciona con los niveles sanguíneos de E2 (Yin y Arita, 2002). Es conocido que los E2 incrementan la sensibilidad en las células de la adenohipofisis ante diferentes estímulos apoptóticos (Candolfi y col., 2004; Pisera y col., 2004; Jaita y col., 2005).

La Dopamina (DA) es una catecolamina que participa en el control de muchos procesos fisiológicos, entre ellos la secreción neuroendocrina (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001). Su acción es mediada por cinco receptores de membrana diferentes, agrupados en dos familias.

La familia *símilo D1*, incluye los receptores D1 y D5, que se caracterizan porque se acoplan a proteínas Gs que conllevan la activación de la adenil ciclasa y la familia *símilo D2*, incluye los receptores D2, D3 y D4; se caracterizan por interactuar con proteínas Gi/Go, que reducen la acumulación de cAMP (Missale y col, 1998).

Existen, además, las proteínas transportadoras de DA (DAT) que controlan la intensidad y duración de la neurotransmisión dopaminérgica mediante la recaptación de DA desde la hendidura sináptica (Storch y col., 2004).

La DA induce apoptosis en diferentes tipos celulares ya que antagonistas de la DA (receptores D1 y D2) inhiben la inducción de la muerte celular (Chen y col., 2003; Charvin y col., 2005), lo que indica que la acción de la DA se ejerce a través de estos receptores.

También parece demostrado que el bloqueo de los DAT inhiben la muerte celular inducida por la DA en la muerte celular de la línea PC12, lo que indica que es necesario la intervención de las DAT en la apoptosis de esta línea celular (Blum y col., 2001).

Los efectos mediados por los estrógenos en hipófisis normales y tumorales parecen ser altamente dependientes de la expresión de las isoformas de receptor estrógeno α y β (Lee y col., 2001).

La proteína morfogenética del hueso BMP-4, está altamente expresada en prolactinomas, incluyendo prolactinomas humanos y de ratas inducidos por estradiol (Stefaneanu y col., 1994).

El péptido pituitario activador de la adenil-ciclasa (PACAP) está presente en todos los adenomas hipofisarios y al parecer está implicado en la proliferación y síntesis hormonal en la mayor parte de las líneas celulares de la hipófisis, así como en los cultivos primarios de los adenomas humanos (Vaudry y col., 2000).

También la activación de los receptores D2 inhiben la expresión del gen de la prolactina y reduce la proliferación de las células lactotropas (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001; Sarkar y col., 2005).

Para Radl y col. (2008) la DA induce apoptosis solo en presencia de E2, sugiriendo que la DA ejerce una acción permisiva sobre la apoptosis en la adenohipofisis y, concretamente, en las células lactotropas, cuando se dan circunstancias especiales como la actuación de E2.

AROMATASA HIPOFISARIA

El colesterol es el precursor de los esteroides sexuales además de otras hormonas. Los esteroides sexuales comprenden los andrógenos, los estrógenos y progestágenos.

Los andrógenos, formados por 19 átomos de carbono y los estrógenos por 18, son necesarios totalmente para el proceso de reproducción de los vertebrados. Según Conley y Walters (1999) en ausencia de los esteroides no se podría llevar a cabo el proceso reproductivo.

La aromatasa pertenece a la superfamilia de citocromos P450, concretamente es el citocromo aromatasa P450; esta superfamilia está constituida por 74 familias y por más de 480 miembros, estando la aromatasa dentro de la familia 19 (Nelson y col., 1996). Interviene en la biosíntesis de los estrógenos; es la enzima responsable de la conversión de los andrógenos (testosterona y androstendiona) en estrógenos (estradiol y estrona) u hormonas que se constituyen en el final de la ruta esteroidogénica.

La aromatasa P450 está altamente conservada en todos los vertebrados y especialmente en los mamíferos. El gen que codifica esta proteína es el Cyp19 y, aunque depende del tejido y especie que se considere, la proteína posee 490 y 525aa (Chang y col. 1997; Cruz y Canario, 2001) y un peso molecular de 55000 daltons.

La aromatasa es una oxidasa que cataliza una reacción en la que remueve el grupo metilo del carbono 10 de la testosterona como ácido fórmico; posteriormente, reorganiza el anillo A hacia una estructura aromática. La reacción requiere NADPH y consume tres moles de oxígeno.

Dentro de la célula la enzima se localiza en el retículo endoplásmico liso. Esta asociación de la enzima al retículo se ha conservado a lo largo de la evolución (Simpson y col., 1994).

En mamíferos, la aromatasa se expresa en diversos órganos y tejidos, tales como: gónadas (testículo, ovario) cerebro, hígado, tejido adiposo, placenta y sistema nervioso central, fundamentalmente en el hipotálamo (área preóptica medial) y estructuras sexualmente dimórficas (Simpson y col., 1994), sabiéndose que el estrógeno sintetizado extragonadalmente actúa predominantemente a nivel local de manera paracrina o autocrina (Labrie y col., 1998).

La aromatasa presenta una distribución neuroanatómica limitada en la rata (Nebert y González, 1987). Los primeros estudios realizados en disecciones en fresco del cerebro, demostraron la existencia de actividad aromatasa positiva en el diencefalo y la amígdala (Naftolin y col., 1974; Selmanoff y col., 1977; Roselli y col., 1984; Callard, 1984). Mediante microdissección por punción, los lugares de mayor actividad se detectaron en los núcleos del sistema límbico y regiones subyacentes, como el núcleo en lecho de la estría terminal, área preóptica periventricular, área preóptica medial, hipotálamo ventromedial y amígdala córticomedial (Roselli y col., 1985).

También se ha descrito inmunorreactividad en algunas zonas cerebrales donde no se había detectado la actividad enzimática como la banda diagonal de Broca, el tubérculo olfativo, el núcleo reticular del tálamo y la porción ventral del núcleo pálido (para una descripción más exhaustiva sobre el dimorfismo sexual y la vía olfativa, ver Segovia y Guillamón, 1993).

También, la expresión inmunocitoquímica de la aromatasa se ha demostrado en la mayoría, aunque no en todas, las áreas cerebrales (Shinoda y col., 1989b; 1990; Balthazart y col., 1991a; Sanghera y col., 1991; Tsuruo y col., 1994; Foidart y col., 1995).

En la rata se han descrito distintas isoformas para la Aromatasa P450, que difieren parcialmente en la secuencia aminoácido carboxi-terminal, lo que podría justificar algunas de las diferencias observadas por los distintos autores en la localización del enzima, fundamentalmente en el sistema nervioso central.

Al menos, en el sistema nervioso central (SNC) la respuesta de la aromatasa o de la actividad de la aromatasa a la testosterona circulante no es uniforme, de manera que las neuronas con actividad aromatasa responden o no a la testosterona dependiendo de su localización (Hutchison y col., 1991a). Así, *in vitro*, las neuronas hipotalámicas del ratón presentan una actividad aromatasa mayor en el macho que en la hembra durante el desarrollo pre y perinatal; sin embargo, esa diferencia no existe en las neuronas de la corteza cerebral (Beyer y col., 1993).

En el SNC, la testosterona actúa uniéndose a un receptor específico proteico o receptor androgénico, desencadenando alteraciones en la expresión génica y en las funciones neuronales (Carson-Jurica y col., 1990; Sar y col., 1990).

La testosterona se metaboliza intracelularmente para desarrollar sus acciones biológicas a través de dos rutas principales (Martini, 1982; Fox y Baum, 1987). Por un lado, se transforma en 5α -dihidrottestosterona por actuación de la 5α -reductasa; esta 5α -dihidrottestosterona es un andrógeno aun más potente que la misma testosterona y actúa a través del mismo receptor androgénico.

Por otro lado, en una segunda ruta, la testosterona se transforma en 17β -estradiol, por acción de la aromatasa P450 y los estrógenos así constituidos en el interior de la célula a partir de la testosterona, interactúan con el re-

ceptor estrogénico, un sistema proteico de receptor nuclear y/o citoplásmico, diferente al receptor androgénico (McCarthy, 1994).

Existe una alta coincidencia entre las zonas hipotalámicas con actividad aromatasa y la presencia de receptores androgénicos y estrogénicos, como ocurre en el área preóptica anterior (Sar y Stumpf, 1975; Stumpf y col., 1975; Selmanoff y col., 1977; Roselli y col., 1985), habiendo sido demostrada inmunocitoquímicamente (Beyer y col., 1994c).

Al parecer, algunas conductas, como la sexual, dependen de la conversión en estrógenos de la testosterona (Sachs y Meisel, 1989), siempre que se mantenga la actuación de la 5α -reductasa y la producción de 5α -dihidrotestosterona (De Bold y Clemens, 1978; Steel y Hutchison, 1988; Roselli, 1991).

Está bastante admitido que la actuación de la aromatasa sobre el área preóptica medial durante el desarrollo pre y postnatal precoz, conduce a una diferenciación sexual del hipotálamo de la rata macho y el tratamiento pre y postnatal con inhibidores de la aromatasa, determina alteraciones importantes en la conducta sexual del macho y parece inducir una tendencia hacia la homosexualidad (Houtsmuller y col., 1994). Se establece el periodo crítico de actuación con anterioridad al decimosegundo día posparto (González y Leret, 1994).

Sólo los andrógenos aromatizables estimulan la conducta sexual en la cópula (McDonald y col., 1970; Feder, 1971; Whalen y Luttge, 1971), que es suprimida si se inhibe la síntesis cerebral de estrógenos o se emplean antiestrógenos (Luttge, 1975; Beyer y col., 1976; Morali y col., 1977).

Ello conduce a afirmar que existe una importante diferencia, dependiente del sexo, en la actividad in vitro de la aromatasa en las neuronas hipotalámicas y que los andrógenos influyen sobre la diferenciación sexual de

las neuronas hipotalámicas productoras de aromatasa en el periodo embrionario.

Hallazgos muy recientes sugieren que la diferenciación de estructuras sexualmente dimórficas no sólo acontecen perinatalmente, sino que también ocurren, sobre todo en el núcleo periventricular antero lateral del hipotálamo de la rata, peripuberalmente (Davis y col., 1996), confirmando hallazgos anteriores en otras especies animales en los que se detectó actividad de la aromatasa cerebral en fases sexualmente activas y dependiente de la funcionalidad gonadal (Hutchison y col., 1992).

Dentro de esas áreas, la preóptica medial está considerada como el primer lugar de estimulación hormonal en la conducta copulatoria (Krey y col., 1982; Bitran y col., 1988), aunque la amígdala córticomedia también está implicada en la conducta sexual de la rata macho y de otras especies (Krey y col., 1982; McGregor y Herbert, 1992).

La inmunohistoquímica ha demostrado la presencia de aromatasa principalmente en el pericarion (retículo endoplásmico) y en los procesos gruesos de las neuronas reactivas.

Se ha descrito la presencia de aromatasa en terminales axonales en una gran cantidad de especies animales (Naftolin y col., 1996), confirmando la presencia del enzima en sinaptosomas descrita anteriormente por el mismo grupo (Balthazart y col., 1991b).

Dado que se ha descrito la formación de neuroesteroides en las células de estirpe glial, algunos autores han analizado el tipo celular que contenía inmunorreacción para la aromatasa; según los estudios de Beyer y col. (1994b), las células inmunorreactivas son exclusivamente de estirpe neuronal y no glial, tanto en la corteza cerebral como en el hipotálamo, lo que coincide

con los hallazgos obtenidos *in vitro* analizando la actividad enzimática de la aromatasa (Negri Cesi y col., 1992).

Como hemos visto anteriormente, la hipófisis sufre cambios de plasticidad, en determinadas circunstancias endocrinas y dependiendo del estado endocrino general.

El estradiol es un esteroide gonadal que actúa como agente regulador del sistema endocrino actuando sobre la hipófisis y también sobre el hipotálamo, de forma que ejerce un mecanismo de feed back regulador sobre alguna de las células adenohipofisarias.

Desde los años 70 se sabe que el estradiol estimula la síntesis y liberación de prolactina, la proliferación de las células productoras de dicha hormona e, incluso, que puede generar prolactinomas inducidos mediante un tratamiento crónico.

La aromatasa ha sido estudiada, como hemos visto, en diversas partes del cerebro, incluido el hipotálamo. Sin embargo, en la hipófisis nuestro Departamento ha realizado estudios, demostrando que la hipófisis es un órgano dimórfico sexual.

Vázquez (1997) y Carretero y col. (1998) estudiando fetos de rata, encontraron que ésta se manifestaba en el día 17, incrementándose en el 18 y 19, incremento que se relacionaba con un aumento del índice mitótico.

Más tarde, Carretero y col. (1999, 2002 y 2003) han seguido analizando la aromatasa hipofisaria. Así, en la rata macho adulta, un 34,40% de las células eran aromatasa positivas y sólo un 0,84% lo eran en la rata hembra. Analizado el comportamiento desde el nacimiento hasta la edad adulta se comprobó que a los 17 días era patente la aromatasa, tanto en el macho como

en la hembra, no encontrando diferencias significativas en relación con el sexo. Al cabo de 14 días disminuyó en las hembras sin modificarse en el macho. La disminución, en las hembras, fue muy patente, tanto a los 17, como a los 21 y 60 días, mientras que en los machos era abundante; por último, a los 24 meses, la reacción en los machos había desaparecido.

Experimentalmente, analizados los prolactinomas inducidos por la edad, en la rata, se comprobó que el 100% de los prolactinomas puros de una serie de 90 prolactinomas fueron aromatasa positivos (Carretero y col., 2002).

PROLACTINOMAS

Dentro de los adenomas, los que segregan un exceso de prolactina se denominan prolactinomas, siendo los más frecuentes dentro de los adenomas hipofisarios (Hardy, 1980; Ishibashi y Yamaji, 1985).

Los datos más recientes que se poseen hablan que entre los tumores intracraneales un 17% son adenomas; después de estudios con TC craneal y de estudiar las autopsias, esta cifra se eleva a un 23% (Ezzat y col. 2004) estimándose que se presentan 100 prolactinomas por cada 1.000.000 de habitantes, aunque esta cifra aumenta hasta seis o siete veces para otros autores (Ciccarelli y col., 2005).

Los prolactinomas son más frecuentes en mujeres que en hombres (10:1) y la incidencia de los mismos tiene un pico evidente entre los 20 y 50 años (Gold, 1981; Aron y Howlet, 2000).

En general, los adenomas hipofisarios se clasifican, según la secreción hormonal, en «*no secretores*» o secretores de hormonas inactivas o que no se-

gregan hormonas, llamados también no funcionantes y en «*funcionantes*», como son los prolactinomas, los más comunes.

También son clasificados según el tamaño de los mismos; de forma arbitraria se dice que aquellos tumores pequeños, de tamaño inferior a 1 cm se denominan microadenomas, siendo los mayores de 1 cm macroadenomas (Byrne, 2008). En el hombre tanto se dan tanto los micro como los macroadenomas (Sarkar, 2006).

Tanto los macroadenomas, los adenomas invasivos o los carcinomas tienen una densidad de vasos superior a los que poseen los microadenomas, adenomas no invasivos u otros adenomas hipofisarios. Ello puede darnos una pista sobre un origen diferente de los microadenomas y macroadenomas (Turner y col., 2003).

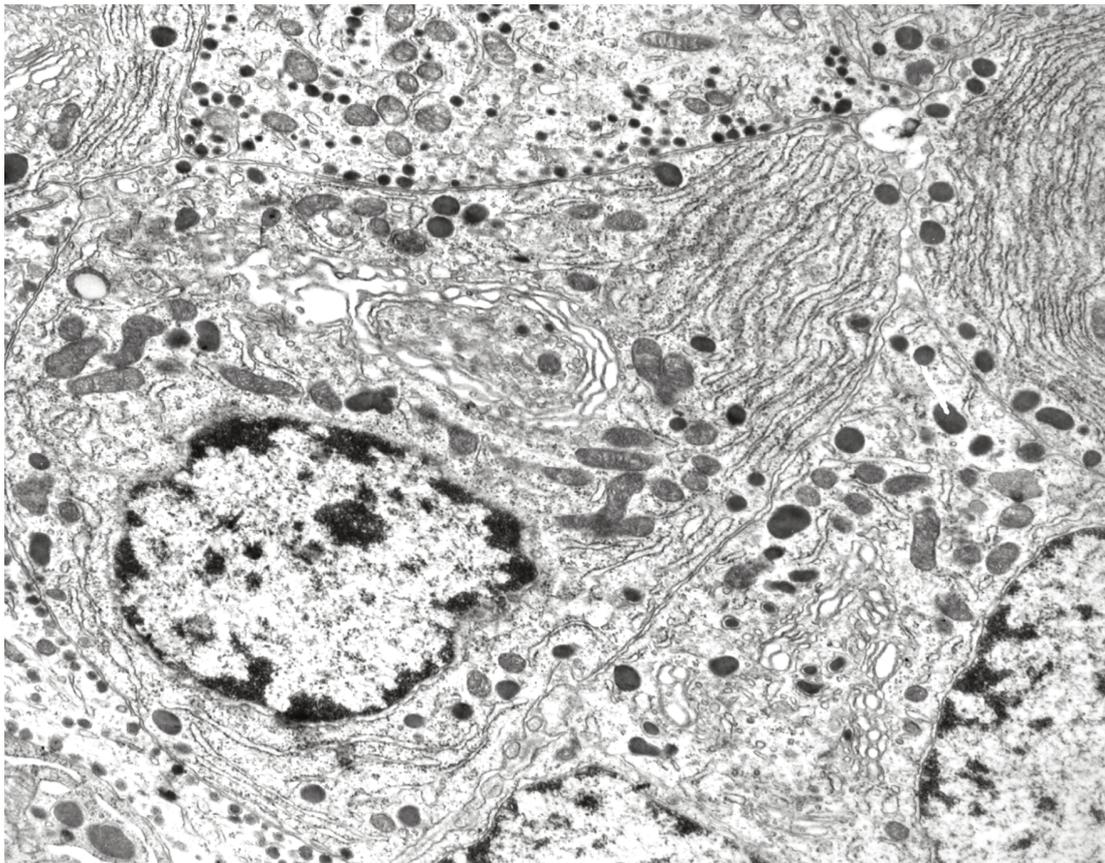


Imagen que nos muestra células de prolactina de rata a microscopía electrónica. Se aprecia bien sus núcleos, el retículo endoplásmico rugoso, el aparato de Golgi, algunos granos de secreción, mitocondrias y cuerpos densos.

Los macroadenomas se diagnostican bien utilizando técnicas de imagen, mientras que los microadenomas son más complicados, necesitando medidas adecuadas para obtener imágenes de gran resolución; sin embargo, mediante técnicas bioquímicas el diagnóstico es fácil y sencillo.

Provocan una morbilidad acentuada debido a la invasión local que producen, al hipopituitarismo o, lo contrario, hiperestimulación hormonal (Asa y Ezzat, 1998; Levy y Lightman, 2003).

El patrón de crecimiento de estos tumores puede ser, expansivo, dando lugar a un crecimiento de la masa tumoral que, a su vez, provoca un aumento de presión sobre el tejido normal de la hipófisis y sobre la silla turca; también puede ser un crecimiento invasivo, rápido, alcanzando no solo el tejido normal de la glándula sino también la duramadre y estructuras paraselares, como el seno esfenoidal y seno cavernoso e incluso alcanzar el quiasma óptico y provocar alteraciones en el campo visual del paciente. Es muy raro que alcancen la fosa posterior o la nasofaringe (Kovacs y col., 1991; Vance, 2003; Kovacs y Horvath, 2005).

La elevación de prolactina en sangre es una de las condiciones para hablar de prolactinoma y suele ir acompañada, en la mujer, de alteraciones en la función reproductiva, como amenorrea, galactorrea e, incluso, infertilidad (McLeod y col. 1980).

La DA inhibe tónicamente la secreción de PRL; neuronas hipotalámicas neuroendocrinas liberan DA que alcanza las células lactotropas por los vasos porta hipofisarios. Después de interactuar con receptores D2, la DA induce una hiperpolarización de la membrana e inactivación del voltaje de los canales de calcio, reduciendo el calcio intracelular e inhibiendo la liberación de prolactina.

Ratones *knockout* frente al receptor D2, muestran una hiperplasia de las células lactotropas, que más tarde llega a transformarse en tumor (Asa y col., 1999).

Además de la DA, las células hipofisarias, los adenomas hipofisarios y, por supuesto, las células lactotropas, poseen receptores para el péptido hipotálamico liberador de prolactina (Hinuma y col., 1998; Ozawa y col., 2002). La expresión del receptor de este péptido es inhibido mediante el tratamiento adecuado de los adenomas lactotropos humanos (Ozawa y col., 2002).

La prolactina realiza un *feedback* negativo sobre su propia secreción, vía receptor de prolactina, tanto a nivel hipotalámico como hipofisario (Schuff y col., 2002). Ratones deficientes en receptores a la prolactina desarrollan amplios prolactinomas (Schuff y col., 2002).

Los E2 son los principales responsables de la elevación de prolactina y de la hiperplasia de las células lactotropas producidas en la gestación. Contraceptivos orales que contienen estrógenos, no incrementan el peligro de formación de prolactinomas (Wingrave y col., 1980). Sin embargo, la administración de estrógenos ha sido implicada en la patogénesis de prolactinomas en individuos transexuales (Kovacs y col., 1994).

En animales de experimentación un tratamiento con estrógenos causan verdaderos adenomas en roedores (Asa y Ezzat, 2002) guardando relación con el incremento de varios factores implicados en la tumorigénesis hipofisaria, como factor endotelial de crecimiento vascular. Los estrógenos inhiben la expresión de los receptores de somatostatina en las células de PRL (Visser-Wisselaar y col., 1997).

Los prolactinomas contienen altas concentraciones de receptores de estrógenos en todos los tipos de adenomas pituitarios y especialmente en los macroprolactinomas (Stefaneanu y col., 1994).

Diversos mecanismos han sido descritos en la patogénesis de los prolactinomas. Entre ellos están la disregulación del ciclo celular, por modificaciones del gen del retinoblastoma, de las proteínas p27 y p53 y de algunas ciclinas, que de alguna manera intervienen en los mecanismos de proliferación y apoptosis.

Es importante también la presencia de alteraciones de factores de crecimiento, sus receptores y sus vías de actuación (receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos y el factor de crecimiento epidermal). Cambios moleculares pueden ocurrir en estos específicos tumores, así como alteraciones genéticas (Melmed, 2003; Levy y Lightman, 2003; Spada, 2005; Schheithauer y col., 2006).

El problema de la vascularización es un hecho constatado en diversos tumores. Se admite que la vascularización es menor en los tumores hipofisarios en relación con las hipófisis normales, cosa que no ocurre en otros tipos de tumores, como el de próstata, mama, estómago, donde hay un incremento de la angiogenesis; sin embargo, concretamente en los prolactinomas, la vascularización es más manifiesta que en otros tumores hipofisarios, como los adenomas que producen las hormona GH o FSH (Turner y col., 2003). Dentro de la angiogénesis podemos citar el factor vascular de crecimiento endotelial y el factor de crecimiento de los fibroblastos.

Detalles de los factores que son analizados en nuestro trabajo serán expuestos con más detalle en el capítulo de Planteamiento (ver trabajo de Donangelo y Melmed, 2008).

Los adenomas hipofisarios son, fundamentalmente, pero no siempre, de origen monoclonal (Clayton y Farrell, 2004) lo que sugiere defectos moleculares intrínsecos en las células hipofisarias que darían origen al tumor.

Los adenomas clínicamente se tratan con agonistas dopaminérgicos y si la respuesta es buena, los adenomas modifican su morfología de tal manera que los núcleos se tornan heterocromáticos y aparecen signos de involución en aquellas partes que están involucradas en la secreción hormonal (retículo endoplásmico rugoso, complejo de Golgi). La inmunoreactividad a la PRL disminuye y tan solo aparecen algunos granos de secreción típicos de estas células. Estos cambios son, por lo general, reversibles; con tratamientos largos pueden aparecer calcificaciones y fibrosis (Lloyd y col. 1986).

En ratas, tanto machos como hembras, la elevación durante largo tiempo de estrógenos en suero causa hiperplasia y/o adenomas (De Incola y col., 1978; Wicklund y col., 1981).

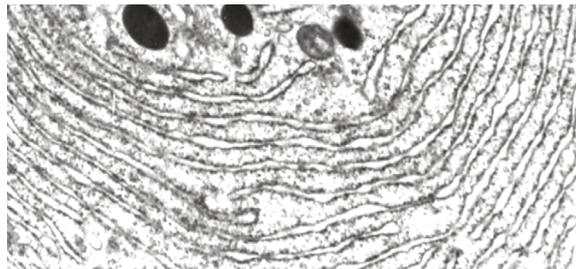
La hiperplasia de las células lactotropas es evidente después de la implantación de estrógenos durante dos semanas y altos niveles de β -estradiol induce la aparición de prolactinomas (DeNicola y col., 1978; Sarkar y col., 1982; Sarkar y col., 1983; Shull y col., 1997).

Sin embargo, no hay evidencia de que la propia hiperplasia sea causa del desarrollo del adenoma, pues en otras circunstancias como la gestación y lactancia, en las que se produce hiperplasia de estas células, no aumenta la incidencia de prolactinomas (Coogan y col., 1995).

Planteamiento

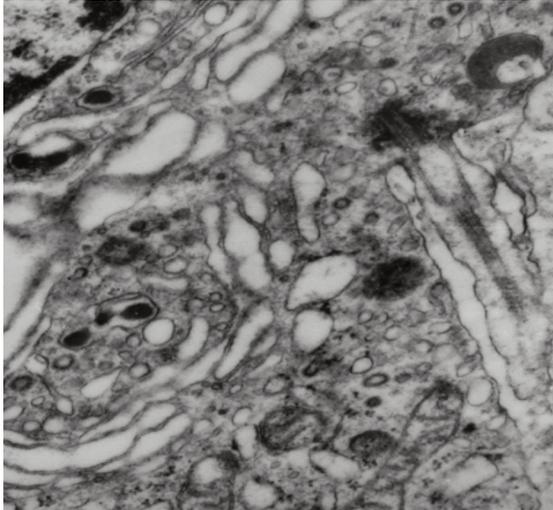
Al ser las hormonas químicamente diferentes, el mecanismo celular para su producción, también es diferente. Los péptidos y las hormonas proteicas o glicoproteicas, como es el caso de la prolactina (hormona proteica), son producto de genes que codifican normalmente grandes precursores.

Los mRNAs, desde el núcleo, son trasladados a los ribosomas y simultáneamente secuenciados en el retículo endoplásmico rugoso, donde la secuencia señal es modificada, realizándose una glicosilación y la formación de puentes disulfuro. El resultante es una prohormona o producto inmaduro que es trasladado al aparato de Golgi, donde se produce una última glicosilación y una fragmentación de la prohormona.

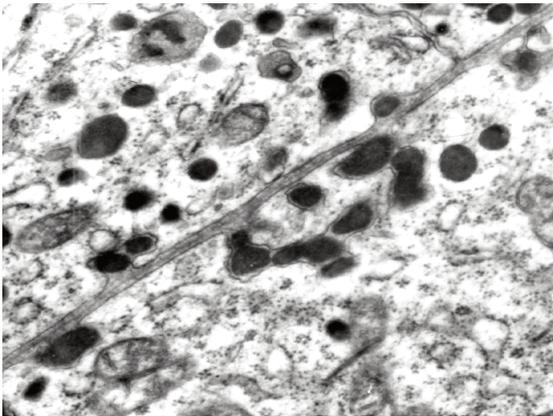


Disposición laminar del retículo endoplásmico rugoso, apreciándose bien las cisternas del retículo y los ribosomas adosados. Corresponde a una célula de prolactina.

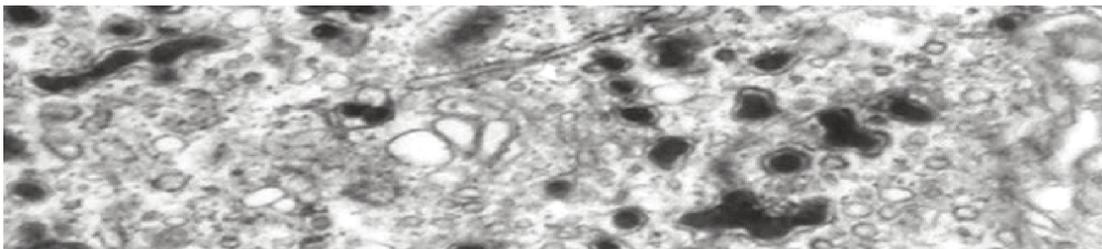
El aparato de Golgi es el encargado de empaquetar la prohormona en vesículas que constituirán los granos de secreción y en ellas actuarán enzimas, prohormonas convertasas (PC1-3) para ir transformando la prohormona en hormona, a la vez que las vesículas son transportadas hacia la membrana citoplásmica, donde liberarán a la sangre la hormona, ya producto maduro; la liberación tiene lugar mediante exocitosis y se hace cuando exista una señal



Cisternas del aparato de Golgi con algún grano de secreción de centro denso y una vacuola con tres formaciones densas. En torno al aparato de Golgi se ven numerosas vesículas.



Varios granos de secreción abriéndose al espacio intercelular correspondientes a dos células de prolactina.



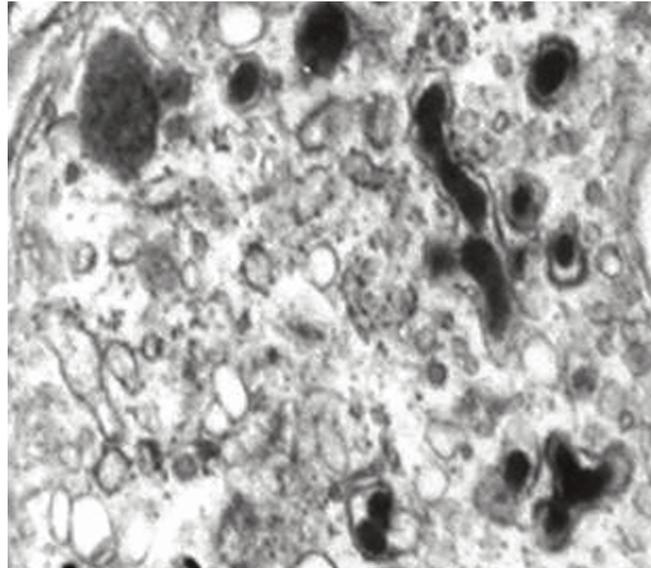
Detalle de granos de secreción irregulares en la zona central del aparato de Golgi.

de liberación; si esta señal no se produce las vesículas que, a microscopía electrónica se denominan de centro denso, son almacenadas en el citoplasma y en ellas se sigue el proceso de fragmentación de la hormona y si ésta no es liberada de la vesícula, se degrada por acción de los lisosomas.

La membrana de las vesículas de centro denso poseen una bomba de protones que mantiene el pH intravesicular ácido, necesario para su proteólisis intravesicular (Morris, 2008).

Como hemos expuesto anteriormente, dentro de la citología adenohipofisaria, está admitido (Benarroch y col., 2008; Morris, 2008), que un tipo celular es el de las células de prolactina o lactotropas, la cuales segregan la hor-

mona prolactina. Estas células son entre un 10 y un 25% del total de la población celular, proliferan en la gestación, pueden ser redondas o irregulares, acidófilas, su núcleo es esferoideo y con nucleolo prominente; poseen bastante retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi muy desarrollado. Las vesículas, que contienen la hormona PRL, pueden ser de tres tipos,



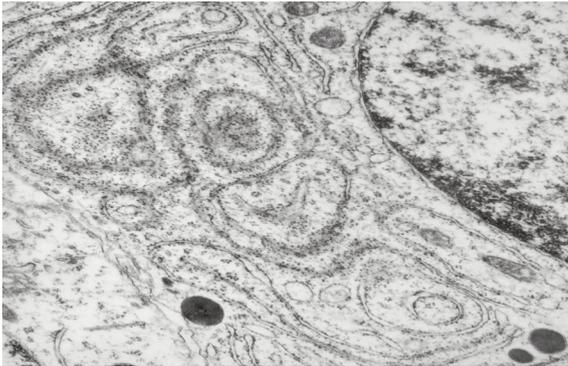
Detalle de diferentes granos de secreción típicos de una célula de prolactina, redondeados unos, alargados e irregulares otros. Se ve un cuerpo lisosomal con una vesícula adosada a él.

Tipo I, de forma ovoide y de tamaño entre 275-600nm; Tipo II, esférica, de menor tamaño que las anteriores, entre 200-300nm y Tipo III también de forma esférica, pero aún más pequeños, entre 100-200nm.

La hormona prolactina es un polipéptido de 199 aminoácidos y sintetizado, fundamentalmente, en las células lactotropas, siguiendo los pasos anteriormente expuestos para toda hormona de tipo proteico. Sin embargo, hay que decir que la PRL y otras proteínas símil-PRL han sido identificadas en otros tejidos del organismo y, por supuesto, en varias regiones del cerebro diferentes a la adenohipófisis (Ben Jonathan y col., 1996; Fuxe y col., 1997), si bien, es la adenohipófisis la fuente principal de dicha hormona; así, la prolactina y los receptores de prolactina han sido localizados en el hipotálamo (Shivers y col., 1989; Suzuki y col., 2005). Su secreción está estimulada, fundamentalmente, por los estrógenos.

Los tumores hipofisarios son definidos como lesiones ocupantes de la silla turca y, entre ellos, son los adenomas hipofisarios, localizados en las distintas células de la adenohipófisis, los tumores más comunes en esta región (Kon-

togeorgos, 2005). Los prolactinomas son, con mucho, los más frecuentes entre los adenomas pituitarios (Kovacs y Horvath, 1986; Horvath y Kovacs, 1998; Horvath y col., 2002). Se acompañan de hiperprolactinemia, primaria o secundaria, amenorrea e infertilidad en la mujer; en el hombre, la sintomatología es menos clara, apareciendo una disminución de la libido e impotencia.



Disposición circular de las cisternas del retículo, en una célula de prolactina.

La microscopia electrónica ha puesto de manifiesto que los prolactinomas se caracterizan por presentar un aparato de Golgi muy manifiesto, grandes cantidades de retículo endoplásmico rugoso, a veces en forma de círculos concéntricos y exocitosis de las vesículas (Kovacs y Horvath,

1986; Horvath, 1994; Asa, 1997; Horvath y Kovacs, 1998; Scheithauer y col., 2001). Igualmente, la presencia de calcificaciones son relativamente frecuentes, no así depósitos de tejido amiloide (Horvath y Kovacs, 2008).

La patogénesis de estos tumores ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, la iniciación y progresión de los mismos no está, ni mucho menos comprendida.

En relación con el tema de nuestro trabajo, podemos decir que un desequilibrio en la regulación del ciclo celular es una de las causas, pero no la única, en la patogénesis de estos tumores. También los cambios moleculares son patentes sobre todo en los prolactinomas; así, hay cambios en los oncogenes de ciclinas y en los genes supresores de tumores, como el p27KIP1, entre otros factores (Plumpton y Besser, 1969; Hurel y col., 1996; Clark y col., 1998). En los adenomas pituitarios, su regulación y el significado de la apop-

tosis es ampliamente desconocido (Kontogeorgos y col., 1993; Kulig y col., 1999; Losa y col., 2000).

Nuestro trabajo intenta aportar datos sobre la génesis de los prolactinomas y no es más que una parte de los estudios que se vienen realizando en este sentido. Nos proponemos estudiar, en una serie de prolactinomas humanos y en hipófisis, también humanas consideradas como normales, los siguientes factores, que participan en la proliferación o en la apoptosis.

La p27KIP1 o p27. El p27KIP1 codifica la proteína p27. La p27 es una fosfoproteína y forma parte de los CIP o proteínas encargadas de inhibir la actividad de los complejos cdk-ciclinas. La p27 es activa en los dos primeros puntos de control del ciclo, interviniendo en el desarrollo de las fases G1 a S y ayuda a retirar a la célula del ciclo celular, pasándola a G0.

Pertenece a las moléculas que impiden la proliferación celular; en general, los genes que codifican estas proteínas se les denomina genes supresores de tumores.

La progresión en la fase G1 y la transición G1 a S, dependen de la activación secuencial de los complejos cdk 4/6-ciclina D y cdk2-ciclina E, provocando la inactivación (fosforilización) de la proteína del retinoblastoma (pRB) y liberando el factor de transcripción que se bloquea por la unión a la pRB (factor E2f) e impide la activación de los complejos cdk-ciclinas.

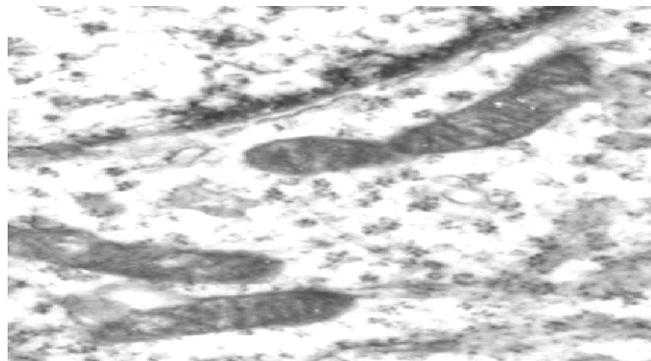
Un desequilibrio entre p27 y las ciclinas está presente en los adenomas hipofisarios y la interrupción del punto de control entre G1 y S favorece el desenfreno progresivo del ciclo y la proliferación (Donangelo y Melmed, 2008).

Al inhibir la cdk, una menor expresión de p27 significará una mayor proliferación y una mayor expresión de p27 conducirá a una disminución de la proliferación (Andrés y Díez-Juan, 2002).

Proteína Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 regula varios pasos de la apoptosis; incluye miembros proapoptóticos y antiapoptóticos. Las proteínas antiapoptóticas contienen 4 dominios Bcl-2 homólogos y entre ellas se encuentran las proteínas Bcl-2, Bcl-xL y McL-1. Entre los miembros proapoptóticos se encuentran dos subgrupos; uno con dominios BH1, BH2, BH y otro, con numerosos dominios BH3 (Adams y Cory, 1998). Para una revisión más amplia ver Bouchier-Hayes y col (2005) Así pues, la proteína Bcl-2 es un miembro antiapoptótico, que bloquea la muerte celular por apoptosis (Reed, 1994; Yang y Korsmeyer, 1996).

La proteína Bcl-2 es una proteína de 24-26 KDa localizada principalmente en la membrana externa de la mitocondria (Kapranos y Kontogeorgos, 2000) y también en la del núcleo y retículo endoplásmico rugoso. Actúa



Mitocondrias alargadas en una célula de prolactina.

entre etapas 1 y 2 de la apoptosis (Huppertz y col., 1999) y contribuye a la progresión de los tumores, inhibiendo la apoptosis (Korsmeyer, 1992) y la supervivencia celular en muchos casos (Kostic y col., 1997).

La Bcl-2 no incrementa la proliferación celular (Sambaziotis y col., 2004) y ha sido observada en numerosos tejidos, entre ellos, el sistema nervioso central (Lichnovsky y col., 1999).

Antígeno nuclear de proliferación celular o PCNA. El antígeno nuclear de proliferación celular es un marcador de proliferación. La señal de PCNA se incrementa en fase G1 del ciclo celular, alcanza un máximo en fase S y es muy baja en fase G2/M.

Este antígeno fue purificado y después de obtener su anticuerpo específico se empezó a estudiar para ver la proliferación nuclear. Es un polipéptido intranuclear de 36 KDa (Takasaki y col., 1984a; Ogata y col., 1985) cuya expresión (Miyachi y col., 1978) y síntesis (Celis y Bravo, 1984) está unido a la proliferación nuclear.

La proliferación ha sido estudiada por Gratzner (1982) que introdujo la bromodeoxyuridina (BrdU) para detectar células en fase S de su ciclo celular. Sin embargo, la detección del marcador PCNA es más amplia, abarca más fases del ciclo, que la que corresponde a la BrDU. La comprobación del marcador PCNA se considera como una buena herramienta para la detección de la proliferación celular humana (Kurki y col., 1988).

En estos estudios de la hipófisis también ha sido utilizado el antígeno nuclear de proliferación celular por Taniguchi y col. (2001) siendo éste el procedimiento utilizado por nosotros.

Caspasa 3 activa. Las caspasas son un grupo de cystein-proteasas (Thornberry y Lazebnik, 1998; Alnemri y col. 1996) esenciales en el proceso de muerte celular programada o apoptosis en numerosas especies (Kumar y Lavin, 1996; Nicholson y Thornberry, 1997). La apoptosis ha sido demostrada como un proceso importante en la oncogénesis hipofisaria (Green y col., 1997; Kulig y col., 1999; Ozer y col., 2003; Sambaziotis y col., 2004; Kontogeorgos, 2005, 2006).

Las caspasas son proteasas relacionadas con la apoptosis, pues rompen determinados sustratos que intervienen, de manera importante, en los mecanismos de la muerte celular (Martin y Green, 1995), pudiendo participar, bien estimulando receptores que provoquen la muerte o bien a través de la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003).

Las diferentes caspasas están agrupadas en tres subfamilias; la subfamilia 1 agrupa las caspasas que intervienen en procesos inflamatorios; el grupo II son aquellas que intervienen en procesos apoptóticos y el grupo III lo integran las llamadas caspasas inductoras. La caspasa 3 pertenece al grupo II, a la subfamilia símil- CPP32.

La caspasa 3 activa degrada gran número de proteínas citoplásmicas y nucleares. Su forma no activa se encuentra en las mitocondrias y en el citoplasma, mientras que la forma activa se encuentra en el citoplasma y en el núcleo (Mancini y col., 1998; Samali y col., 1998; Lavrik y col., 2005).

Al poder ser valorada mediante métodos inmunohistoquímicos, es un marcador que puede ser útil en el estudio de la apoptosis.

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Sobre los adenomas hipofisarios y, concretamente, sobre los prolactinomas, no existen muchos trabajos que analicen los factores implicados en su génesis y que pueden estar modificados.

Pues:

- No se sabe y sólo hay sospechas fundadas de varios factores que pueden intervenir en su génesis y que particularmente estén implicados en la proliferación y apoptosis.

- Existen pocos estudios que analicen el comportamiento de los factores antes citados en los prolactinomas humanos y pocos más en los prolactinomas experimentales.
- La aromatización en la hipófisis es un hecho ya demostrado, al igual que lo es en los prolactinomas; el papel de los estrógenos también es un hecho que puede intervenir en la génesis de estos tumores, pero no está claro la correlación de los diversos factores con la presencia de aromatasa.
- No se conoce el comportamiento de estos y otros factores en el proceso expansivo y posible malignización de los prolactinomas y aunque considerados como tumores benignos, su morbilidad es grande y su posible transformación en carcinomas, la mortalidad puede aparecer.

Teniendo en cuenta todo ello, nuestra hipótesis de trabajo queda planteada en los términos siguientes:

Por no ser conocido la influencia de la proliferación y apoptosis en los prolactinomas humanos y, menos aún, una correlación entre diversos factores y la aromatas P450, planteamos esta hipótesis con los objetivos siguientes:

OBJETIVOS

Después de lo expuesto, la génesis de los prolactinomas, no está, ni mucho menos, clara; por ello, uno de los objetivos de investigación de nuestro Departamento es el análisis de factores que pueden estar patentes en una serie de prolactinomas humanos. Así, en la Tesis Doctoral de Hernández (2009) se analizó el comportamiento del receptor estrogénico α , el coactivador de dicho receptor AIB-1 y la proteína antitumoral p53, todo correlacionándolo con la presencia de Aromatasa P450 en dichos adenomas.

Como objetivo particular de nuestro trabajo pretendemos profundizar en el estudio de esta serie de adenomas analizando la proliferación celular en los mismos, la proteína p27 como inhibidora del ciclo celular y por tanto como factor antiproliferativo y se pretende igualmente en este estudio analizar el estado de apoptosis comprobando el comportamiento de la proteína considerada antiapoptótica, Bcl-2, además de comprobar el comportamiento de la Caspasa 3 activa y analizar así el estado apoptótico de los adenomas y todo ello, también correlacionándolo con la Aromatasa P450, enzima responsable de la aromatización local de testosterona en estradiol.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo se realiza en una serie de 87 adenomas hipofisarios humanos que fueron caracterizados mediante la historia clínica del paciente y la comprobación de hiperprolactinemia, con niveles superiores a 300 ng/mL.

Se intenta dar respuesta a la correlación de la expresión del enzima aromatasa P450, con la proliferación y apoptosis, en prolactinomas humanos.

Para el estudio de la proliferación celular hemos utilizado el antígeno de proliferación nuclear (PCNA) demostrado inmunocitoquímicamente, así como la demostración inmunocitoquímica de la proteína p27. Para el estudio de la apoptosis se ha utilizado el análisis inmunocitoquímico de la caspasa 3 activa, así como la demostración, también inmunocitoquímica, de otro factor importante en el ciclo celular y apoptosis, como es la proteína Bcl-2 y todo ello en una serie de prolactinomas humanos comparados con una pequeña serie de hipófisis humanas, sin adenoma, que hemos considerado como controles.

Material y métodos

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras utilizadas en el presente estudio, proceden del banco de muestras del Servicio de Anatomía Patológica, obtenidas de la extirpación quirúrgica de los tumores en el Servicio de Neurocirugía (Unidad Virgen de la Vega del Hospital de Salamanca) entre los años 1991 y 2002. Las citadas muestras, objeto del estudio, se obtuvieron previo consentimiento informado de los pacientes.

Para realizar este estudio, se utilizaron una serie de 87 adenomas humanos no inducidos por tratamientos previos; éstos se diagnosticaron anteriormente según criterios clínicos y 10 hipófisis humanas no tumorales, procedentes de autopsias clínicas, de personas sin antecedentes clínicos endocrinológicos previos y de características de edad y sexo semejantes a los pacientes con tumores.

Las muestras tumorales se obtuvieron de hipofisectomías neuroquirúrgicas regladas mediante aspiración, lo que justifica la no existencia de bordes bien delimitados en las muestras procesadas.

Por datos de laboratorio se constató, in vivo, la existencia de hiperprolactinemia, en torno o superior a 300 ng/ml en el 55% de todos ellos. Los niveles de prolactina se determinaron mediante ELISA, empleando Kits de

Bioserv Diagnostic, por lo que estaban ya etiquetados, antes de la exéresis, como prolactinomas, dato que después se comprobaría mediante inmunocitoquímica, siendo positivos a PRL.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Tras su obtención, las muestras fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PBS: 0.1M, pH 7.4) durante 24 horas a 4° C para su posterior inclusión en parafina.

INCLUSIÓN EN PARAFINA

La inclusión consiste en reemplazar el agua que contiene el tejido, por un medio líquido capaz de solidificarse, de tal manera que la muestra adquiere una consistencia adecuada para poder obtener cortes de la misma suficientemente finos y sin fragmentarse, manteniendo la estructura de los distintos elementos.

Para realizar este proceso, procedemos, en primer lugar, a la deshidratación de la muestra, pasando las muestras por etanol de diferente gradación progresivamente ascendente. A continuación se hicieron tres pases por xileno para realizar el denominado aclaramiento o desalcoholización, de esta ma-



nera se sustituye el etanol utilizado para la deshidratación, por una sustancia líquida, en la que el medio de inclusión pueda más tarde penetrar de manera homogénea en el tejido.

El medio de inclusión utilizado fue la parafina, se pasaron las muestras por diferentes parafinas fundidas, para finalmente confeccionar el bloque de parafina mediante moldes.



Una vez realizado el bloque de parafina, se obtuvieron cortes seriados de 5 micras de grosor con un microtomo de rotación tipo Minot, estos cortes se colocaron sobre portaobjetos tratados con gelatina alumbre de cromo sobre una placa a 37° C para el estiramiento de los cortes.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Previamente debemos desparafinizar y rehidratar las muestras, para ello se realizan pases sucesivos de xileno y etanol a concentraciones decrecientes:

Xileno	3x5 minutos
Etanol 100° -xileno	1x5 minutos
Etanol 100°	1x5 minutos
Etanol 96°	1x5 minutos
Etanol 70°	1x5 minutos
Agua destilada	1x5 minutos

INMUNOCITOQUÍMICA

Los estudios inmunocitoquímicos se han realizado empleando métodos enzimáticos de marcaje simple con Biotina-Estreptoavidina-Peroxidasa que se reveló con 3-3' diaminobencidina (Sigma).

Esta técnica se ha empleado para demostrar en los prolactinomas humanos, la presencia de: aromatasa, hormona prolactina, antígeno nuclear de proliferación nuclear, caspasa 3 activa, proteína Bcl-2 y proteína p27.

ANTICUERPOS EMPLEADOS

Se han empleado los siguientes anticuerpos:

Suero anti-Aromatasa P450 humana (Rb-SG 1230) policlonal, obtenido en conejo, diluido 1:500 en TBS.

Suero Ig G anti-Prolactina humana, policlonal obtenido en conejo (Dako, diluido 1:900 en TBS).

Suero Ig G anti-PCNA, monoclonal obtenido en ratón (Dako, diluido 1:2500 en TBS).

Suero Ig G anti-Caspasa 3 activa, monoclonal obtenido en conejo (BD Pharmingen, diluido 1:500 en TBS).

Suero Ig G anti-Bcl-2, monoclonal obtenido en ratón (Boehringer Mannheim) diluido 1:300 en TBS.

Suero Ig G anti-p27, monoclonal obtenido en ratón, gentilmente cedido por el Doctor Jaime Font de Mora, diluido 1:850 en TBS.

El suero anti-Aromatasa humana es un suero policlonal obtenido mediante dos semanas de inmunización según el protocolo de Sigma GenoSys®. Para la inmunización se empleó la secuencia peptídica NMLEMIFTPRNSDRCLEH, acoplado a la proteína transportadora KLH/MBS.

La secuencia se corresponde con los residuos 486-503 de la aromatasa P-450 humana (Chen y col., 1986; Harada 1988) PubMed accesión number: P11511; EC number: 1.14.14.1. Para más detalles, ver Tesis Doctoral de Hernández (2009).

PROCESADO INMUNOCITOQUÍMICO

Ha sido idéntico para todas las sustancias, modificando el anticuerpo que, como hemos visto, es específico para cada una de ellas.

Una vez hidratadas las muestras, se incubaron con el anticuerpo primario durante 18 horas en cámaras de humedad a 4° C.

Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados de 5 minutos en TBS, para la eliminación de anticuerpos no unidos a antígenos.

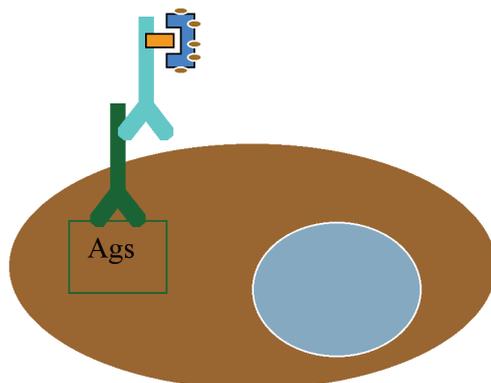
Incubación con el anticuerpo secundario biotinado, durante 45 minutos a temperatura ambiente. En el caso de que el anticuerpo primario fuera monoclonal (PCNA) se empleó Ig G anti-IgG de ratón (Caltag, diluido 1:250 en TBS), para los casos en que el anticuerpo primario fue policlonal (Aromatasa, Prolactina, Bcl-2, Caspasa 3 activa y p27), el anticuerpo empleado fue Ig G anti-Ig G de conejo (Caltag, diluido 1:150 en TBS).

Dos lavados en TBS de 5 minutos cada uno.

Incubación con el complejo estreptoavidina-peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Dos lavados en TBS de 5 minutos cada uno.

Revelado de la reacción empleando H₂O₂ como sustrato para la peroxidasa y 3-3´diaminobencidina (Sigma) utilizado como cromógeno, obteniéndose una coloración marrón donde se localizaba el antígeno a detectar.



Esta reacción se desarrolló a temperatura ambiente, bajo control microscópico. La reacción se paró retirando el cromógeno mediante inmersión de los portas en agua destilada.

Las muestras se sumergieron en hematoxilina ácida de Mayer, durante 20 segundos, se lavaron con agua destilada y se montaron con Aquatex (Merck ®), con cubres de vidrio.

CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES

Los tumores se clasificaron en base al antígeno al que fueron positivos, dependiendo del marcador analizado.

En el caso de las células reactivas a hormonas, sólo los tumores que mostraron una densidad de células reactivas mayor, al menos en un 35%, que los porcentajes establecidos para el tejido hipofisario no tumoral fueron considerados positivos.



TRATAMIENTO DE LOS TEXTOS Y FIGURAS. EDICIÓN FINAL

Las micrografías fueron digitalizadas empleando una cámara digital Nikon ®, acoplada a un microscopio Nikon labophot II, conectada directamente a un ordenador tipo PC Pentium IV® y capturadas y digitalizadas mediante la aplicación Act-2U, v1.60 de Nikon ® , para Windows XP, las imágenes obtenidas se homogeneizaron con la aplicación Adobe CS3 ®, a una resolución final 4000 ppp.

El procesado de los textos, los gráficos y la edición final se realizó con el programa Microsoft Word (Office XP, para Windows XP), empleando el ordenador antes mencionado.

La impresión se ha realizado con una impresora láser color OKI C5600®.

Resultados

Nuestro trabajo está basado en la exposición de los resultados obtenidos de acuerdo con el orden siguiente:

1. Hemos estudiado nuestra serie de adenomas hipofisarios considerando aquellos que correspondían a Prolactinomas
2. En los adenomas de la serie y, por supuesto, en los prolactinomas, se analizó en comportamiento de la aromatasa
3. A continuación se expone el análisis de la proliferación celular mediante el marcaje con PCNA
4. Se analizan proteínas reguladoras del ciclo celular con el marcaje de la proteína p27
5. Estudio de la apoptosis mediante el marcaje de la caspasa 3 activa
6. Estudio de la apoptosis mediante el marcaje de la proteína Bcl-2
7. Correlación entre los distintos marcadores, en los prolactinomas humanos de la serie:

Correlación PCNA y p27

Correlación PCNA y caspasa 3

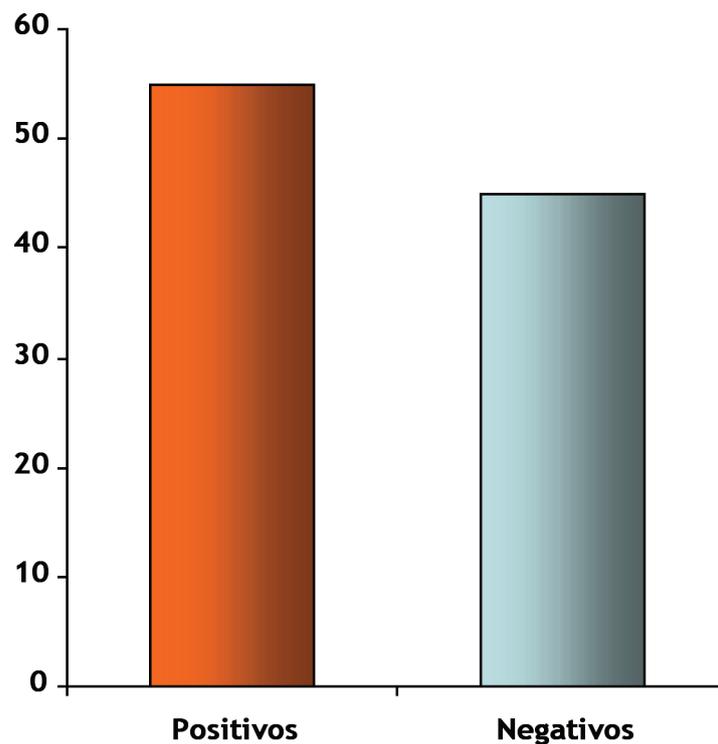
Correlación PCNA y Bcl-2

Correlación caspasa 3 y p27

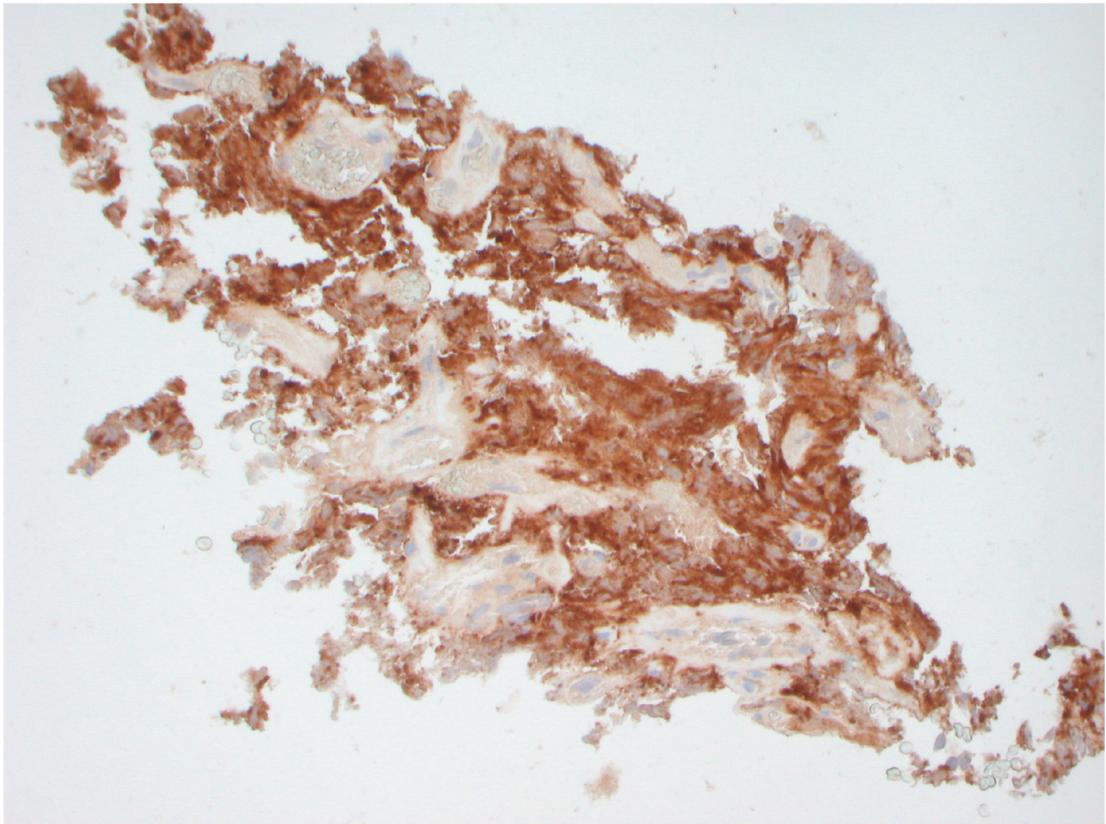
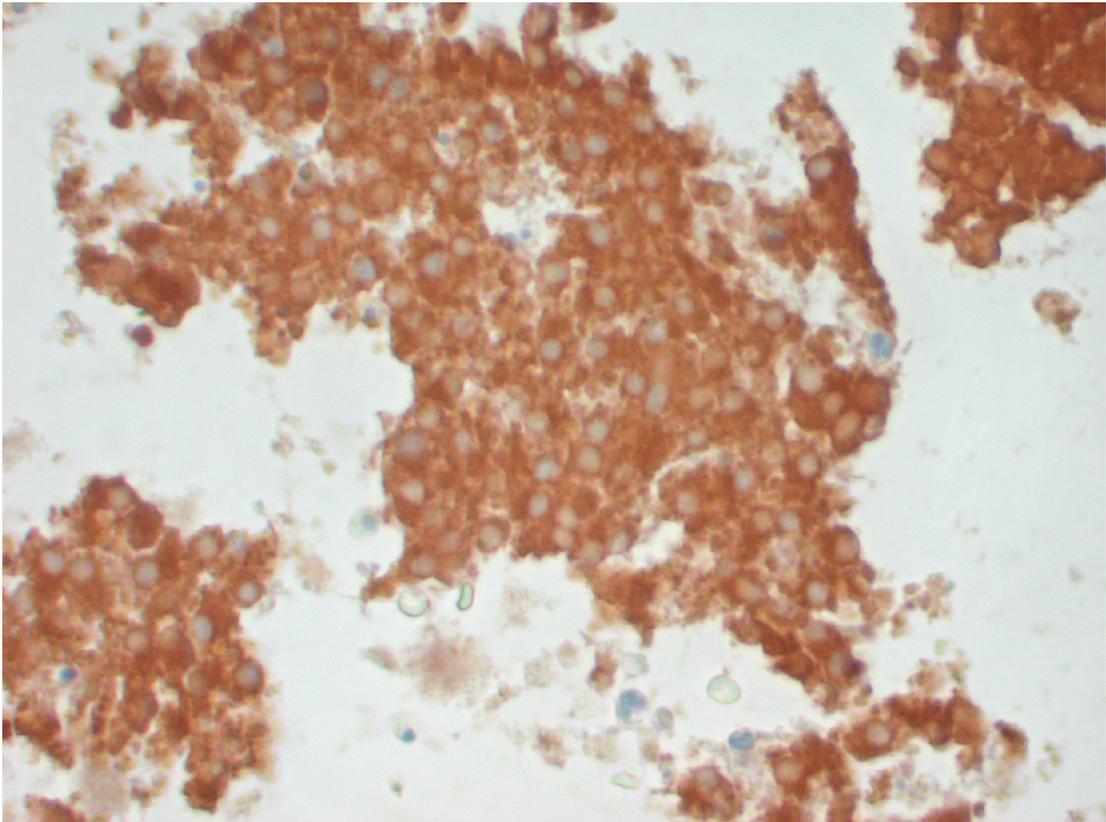
Correlación caspasa 3 y Bcl-2

PROLACTINOMAS HUMANOS

De los 87 adenomas hipofisarios humanos estudiados, el 55% fueron prolactinomas diagnosticados por presentar una hiperprolactinemia superior a 300 ng/ml, antes de la exéresis quirúrgica, y mediante marcaje inmunocitoquímico, posteriormente a la exéresis.



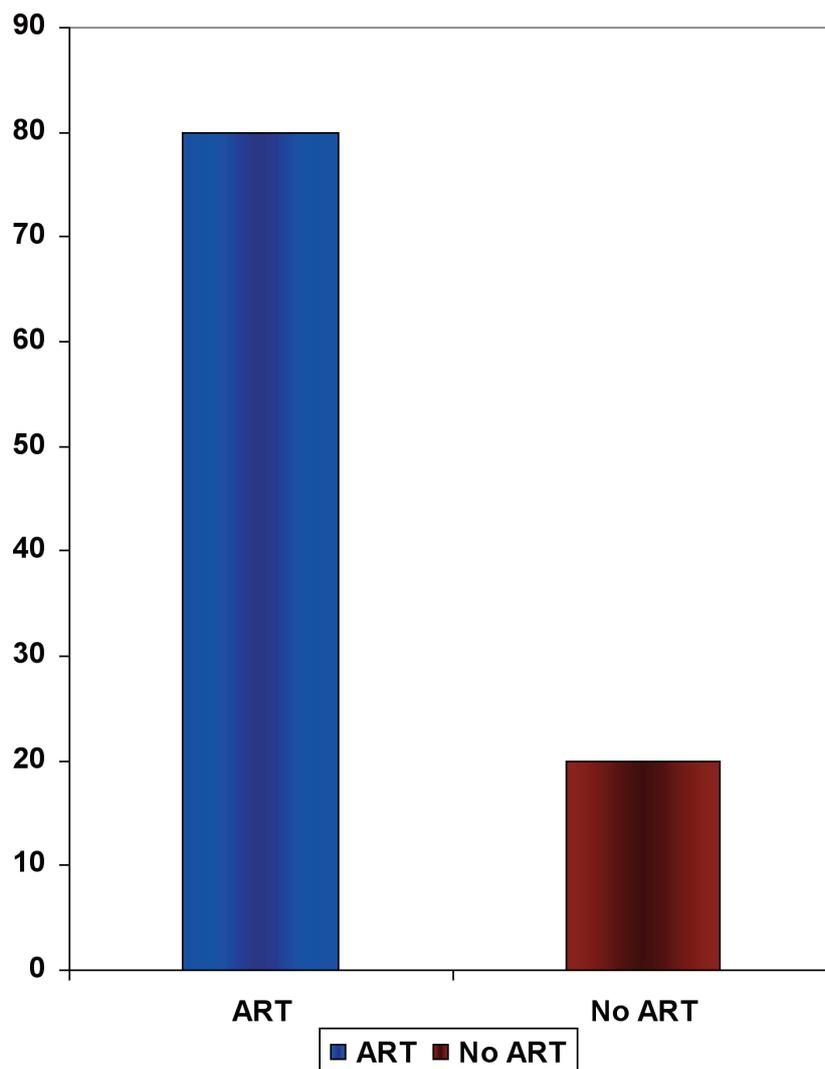
Como puede apreciarse en las dos imágenes de la página siguiente, los prolactinomas se caracterizaron por presentar una fuerte reacción inmunocitoquímica a prolactina, localizada en el citoplasma celular afectando a la casi totalidad de las células glandulares.

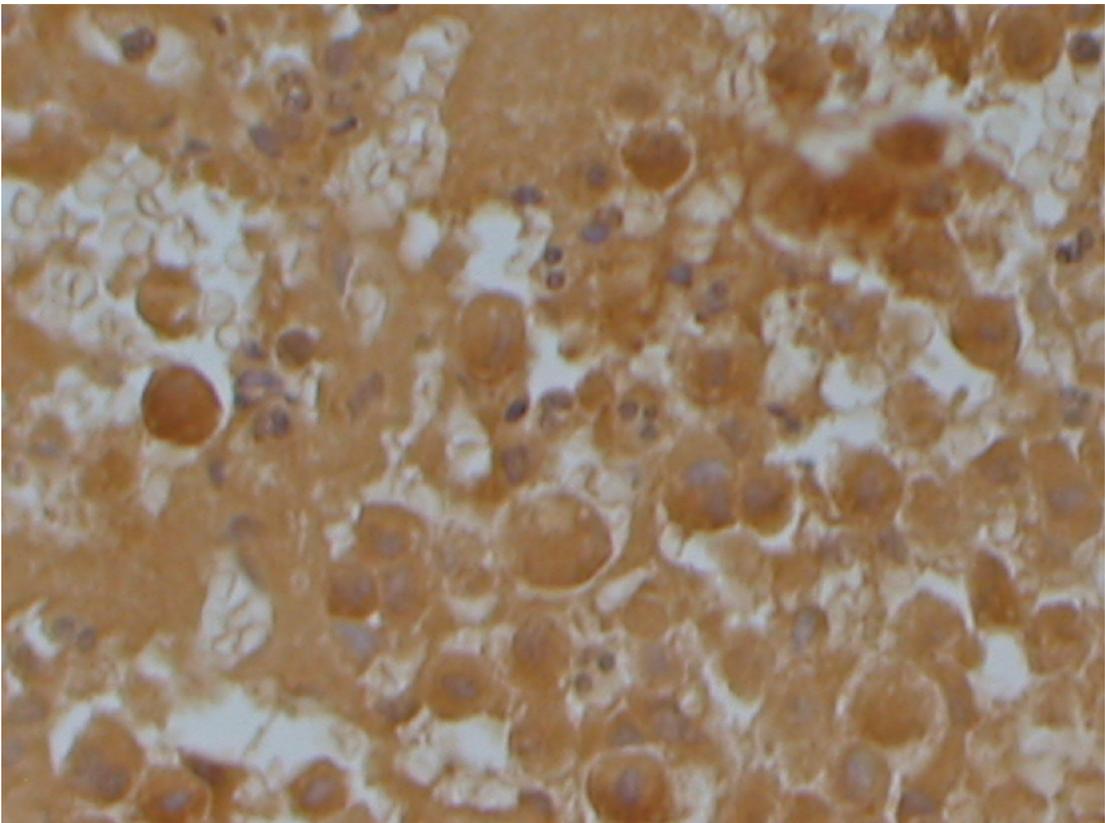
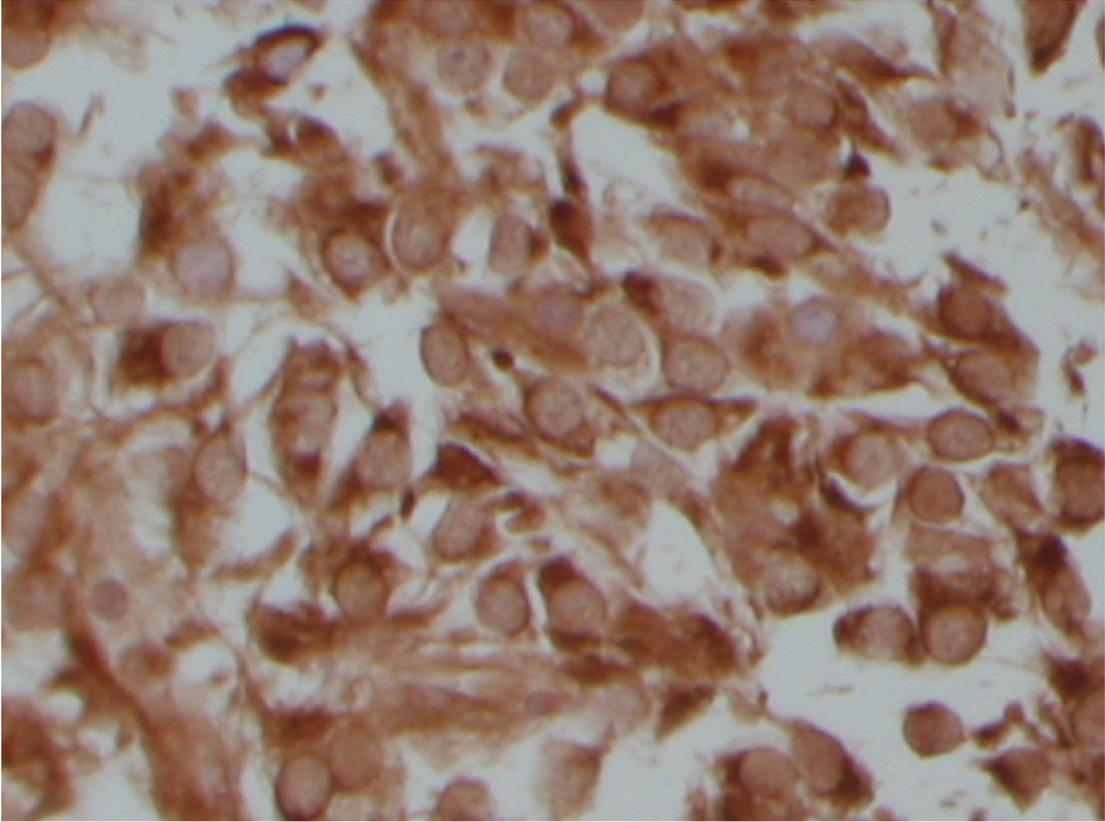


PROLACTINOMAS Y AROMATASA P450

Como puede apreciarse en las imágenes adjuntas, las células positivas a la aromatasa aparecieron distribuidas por toda la superficie del tumor y, al igual que ocurrió con los tumores positivos a prolactina, se encontraron tumores positivos a la aromatasa con características histopatológicas diversas: tumores sólidos o hemorrágicos, con o sin alteraciones nucleares.

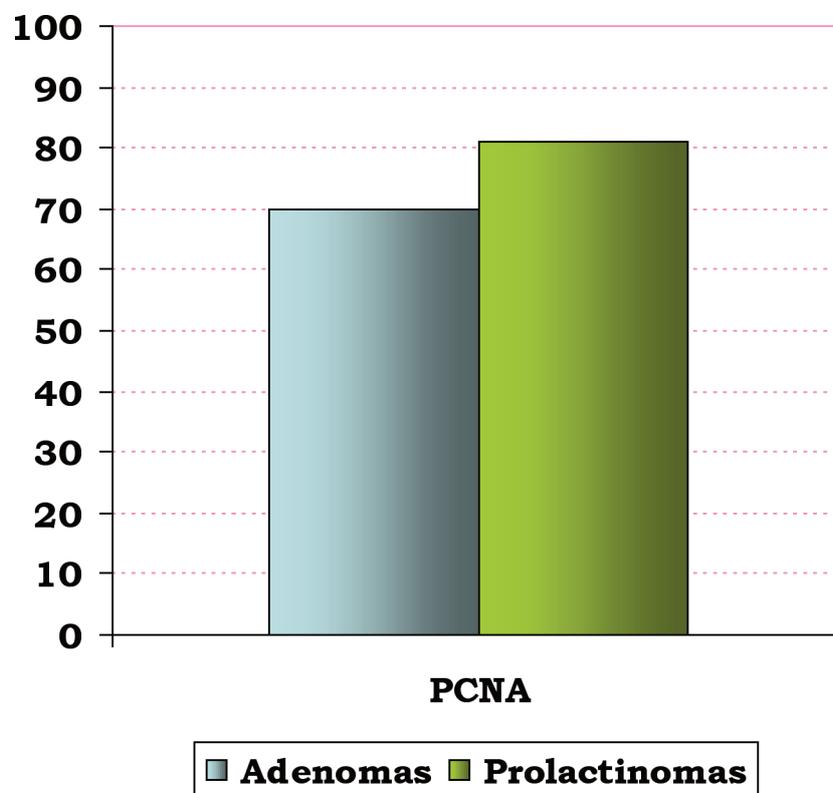
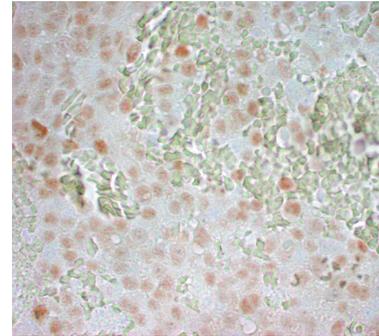
Mediante inmunocitoquímica se comprobó que el 80% de los adenomas hipofisarios fueron tumores aromatasa-positivos. Además, el 100% de los prolactinomas fueron positivos a la aromatasa.





PROLIFERACIÓN CELULAR. MARCAJE CON PCNA

Como se ha descrito en capítulos anteriores, la proliferación celular se ha estudiado mediante el marcaje inmunocitoquímico de los núcleos celulares para el antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA.

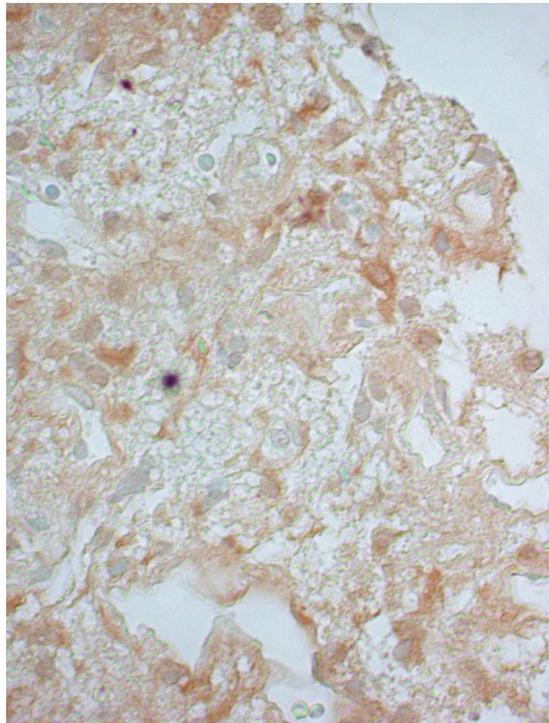
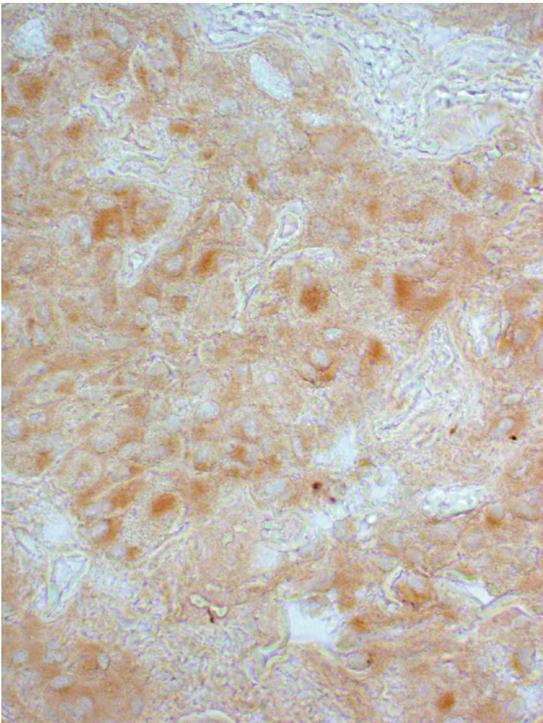
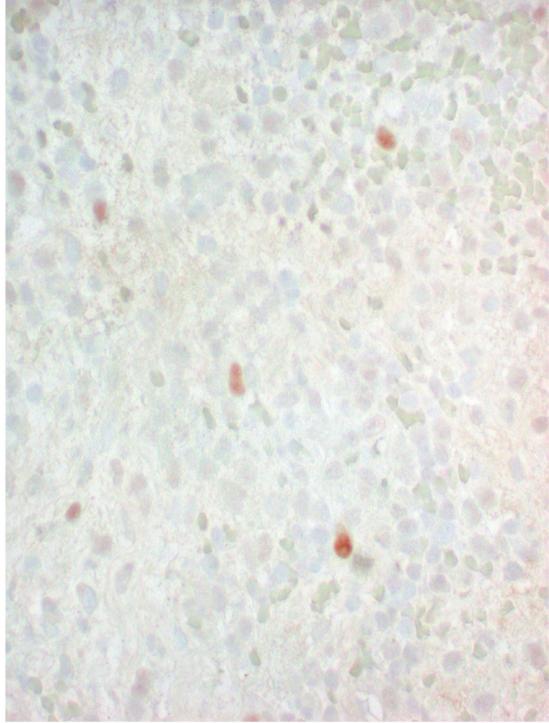
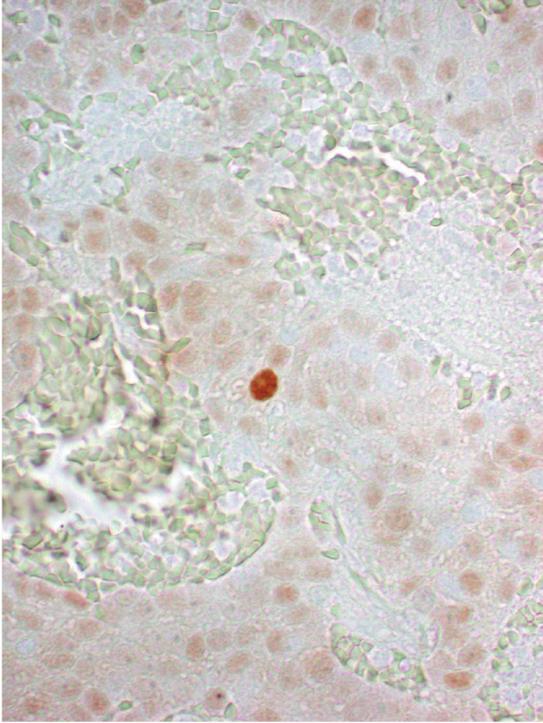


Tal y como puede apreciarse en la gráfica superior, el 70% de los adenomas hipofisarios humanos estudiados presentaron un índice de marcaje para PCNA muy superior al observado en las hipófisis no tumorales.

El índice de marcaje a PCNA fue aún superior en los prolactinomas que en el resto de los adenomas, ya que al considerar exclusivamente los prolac-

tinomas, el 81% de ellos presentaron un índice superior al que se observa en hipófisis no tumorales.

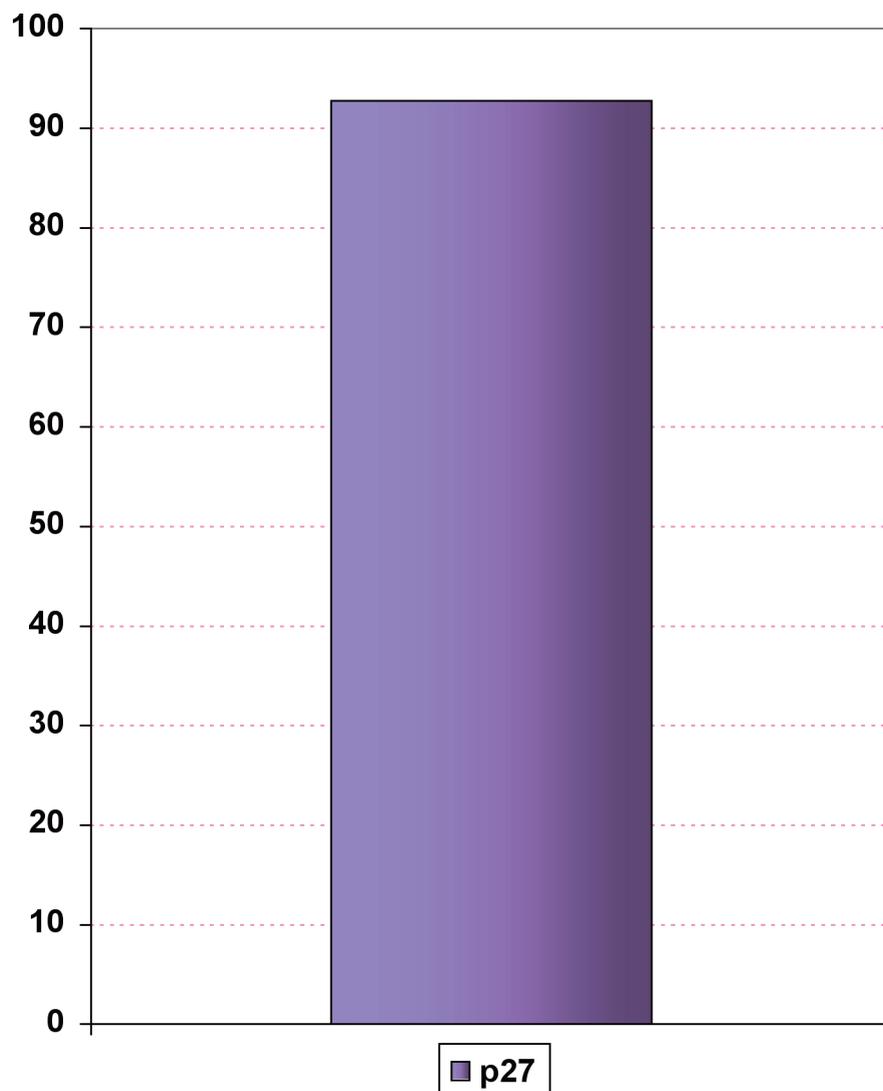
Las imágenes de la página adjunta muestran la positividad a PCNA en algunos de los prolactinomas estudiados, aunque el índice de células marcadas varió de unos prolactinomas a otros, siempre fue muy superior al 3% de las células glandulares, límite superior, aceptado como normal para hipófisis no tumorales.

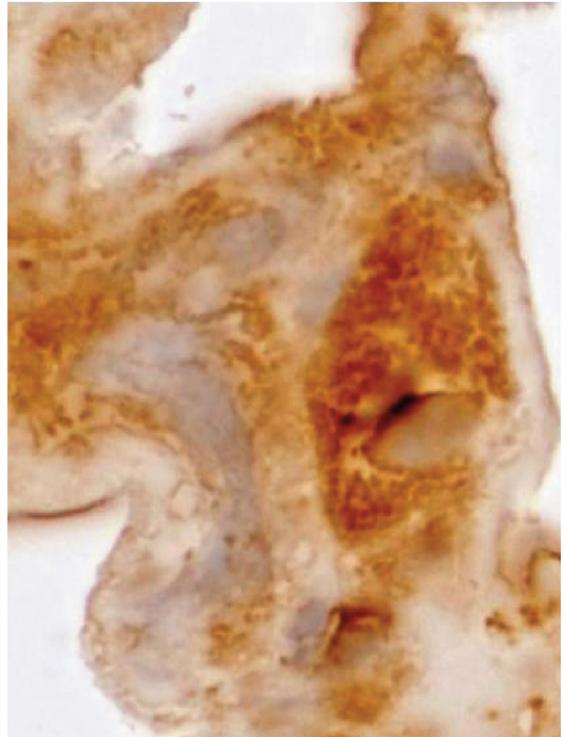
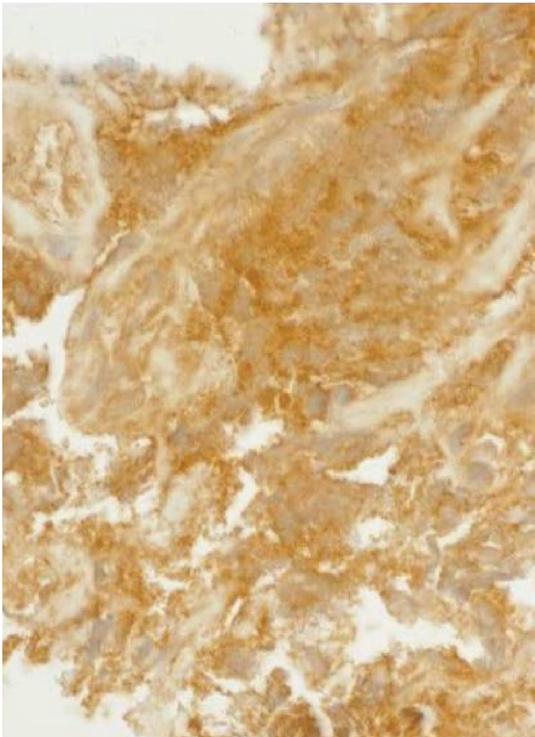
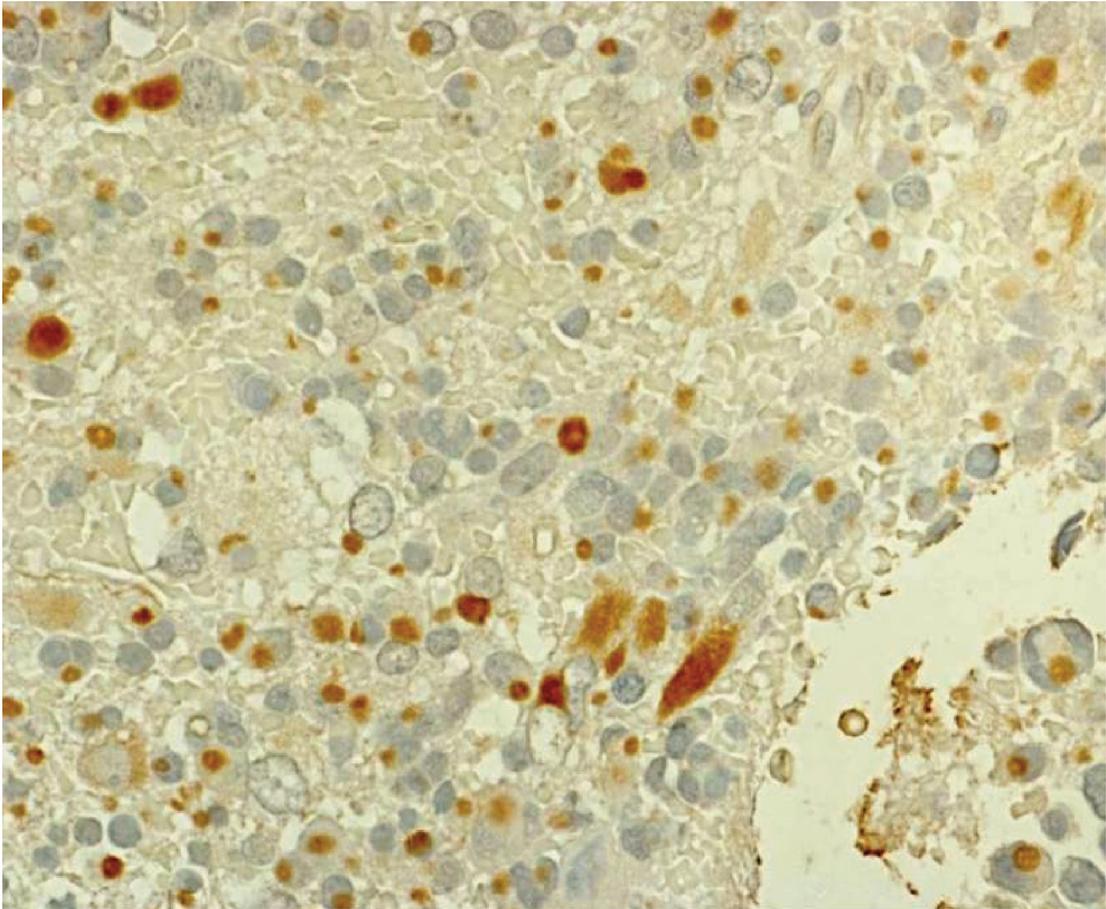


PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR. MARCAJE DE LA PROTEÍNA p27

El marcaje inmunocitoquímico para p27 dio positividad en un 92.73% de los prolactinomas, pero el patrón de marcaje, entendiendo éste como localización intracelular del depósito reactivo, fue diferente de unos tumores a otros.

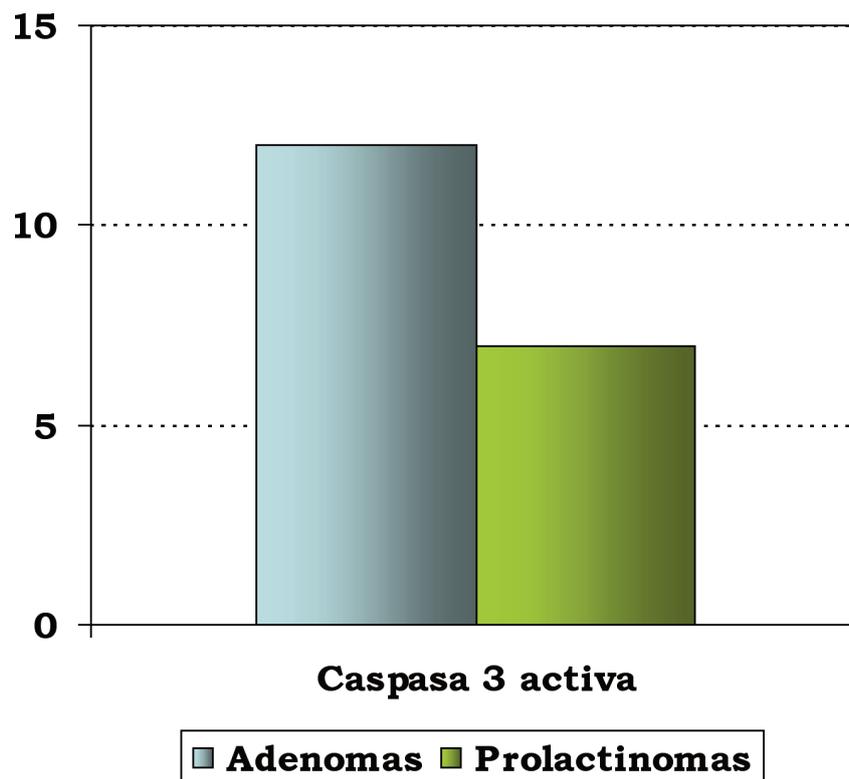
El 85% de los tumores reactivos a p27 presentaron reacción citoplásmica, el 10% presentaron reacción nuclear y citoplásmica y el 5% presentó sólo reacción nuclear.





APOPTOSIS. MARCAJE CON CASPASA 3 ACTIVA

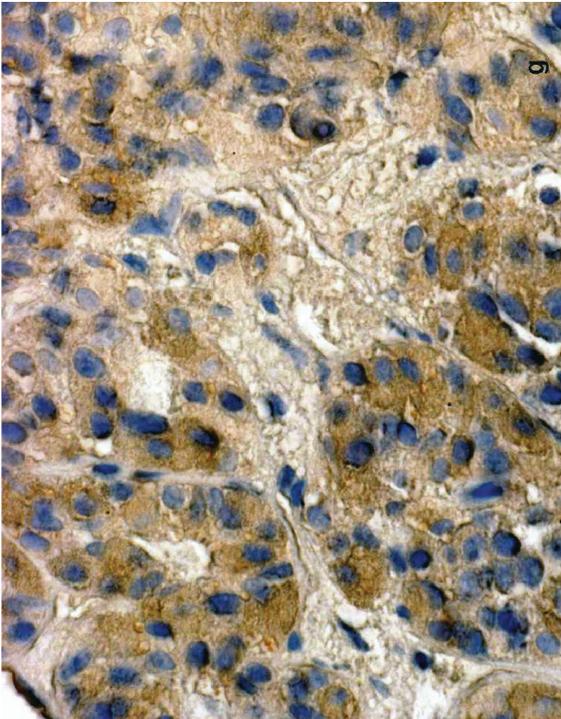
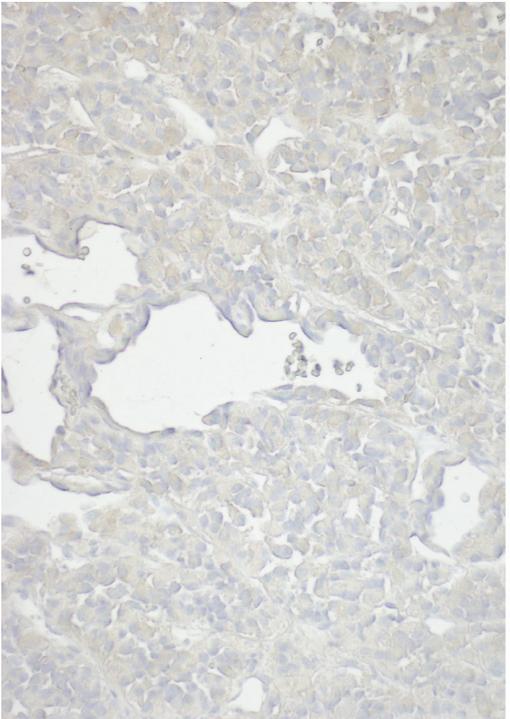
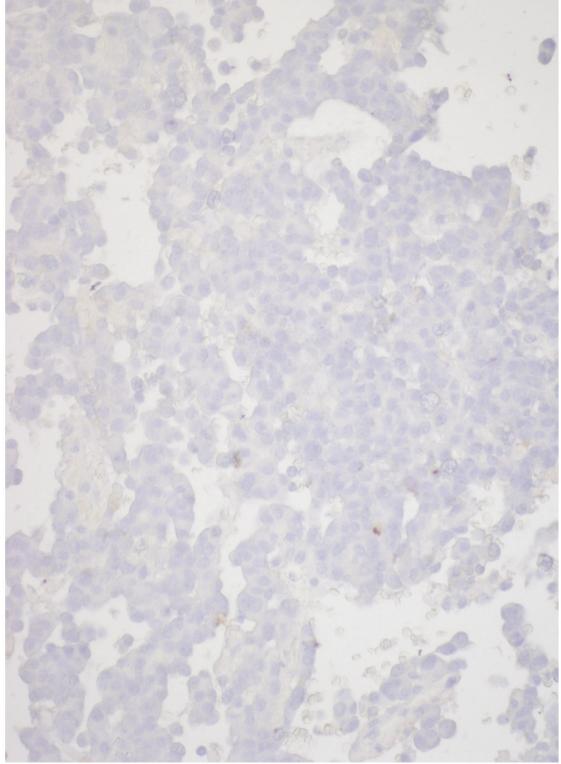
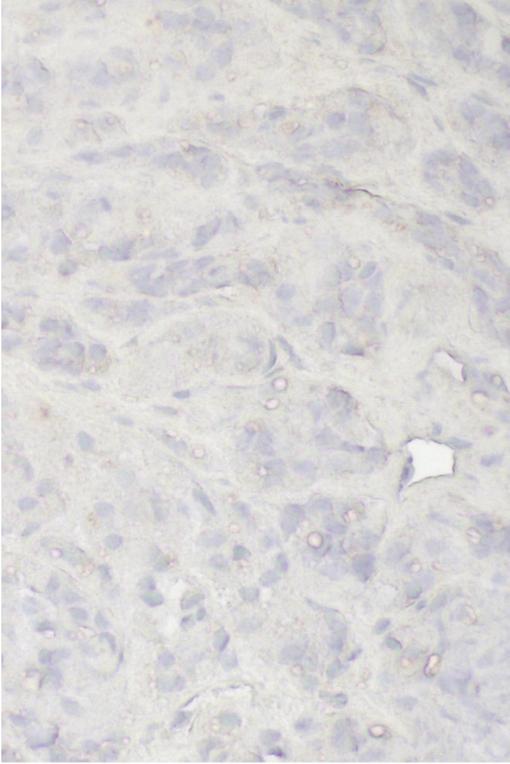
En nuestra serie de tumores, muy pocos fueron caspasa 3 activa positivos, tan sólo el 12% de los adenomas y el porcentaje fue aún menor al analizar los prolactinomas, pues sólo el 7% de estos tumores se marcaron para la caspasa.



Como se aprecia en las fotografías siguientes, la mayoría de los prolactinomas fueron negativos para la caspasa 3 activa.

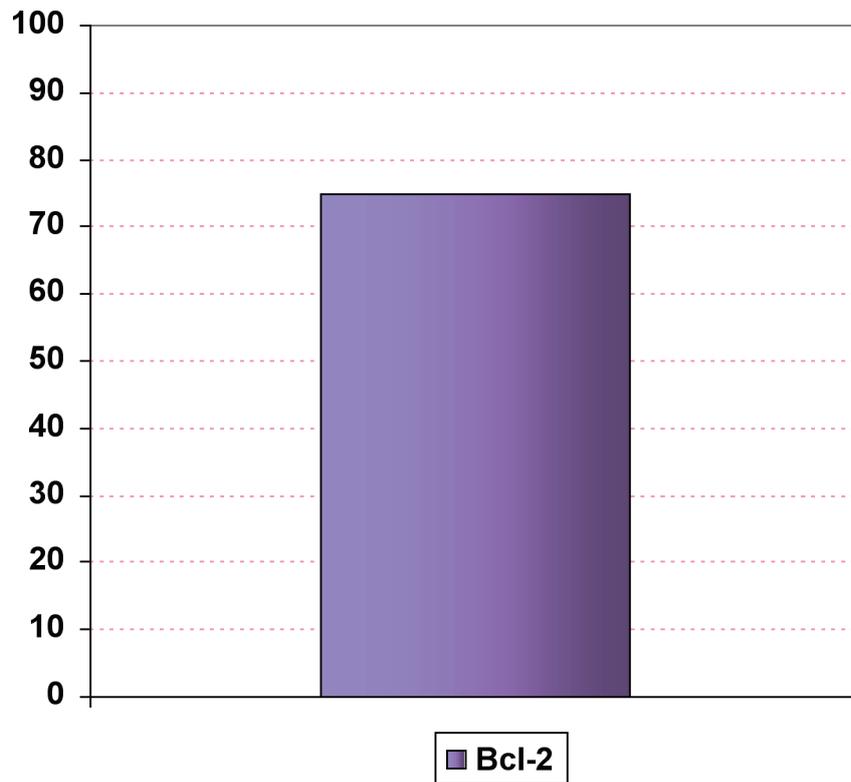
Uno de los tumores presentó una fuerte reacción citoplásmica, aunque no afectaba por igual a todas las células del adenoma (imagen inferior derecha, página siguiente).

El resto de los tumores positivos a la caspasa, presentaron reacción citoplásmica más débil (resto de imágenes).

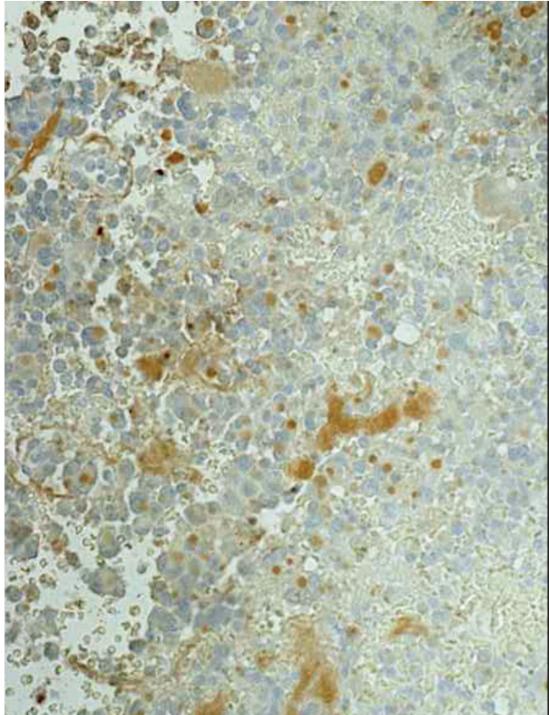
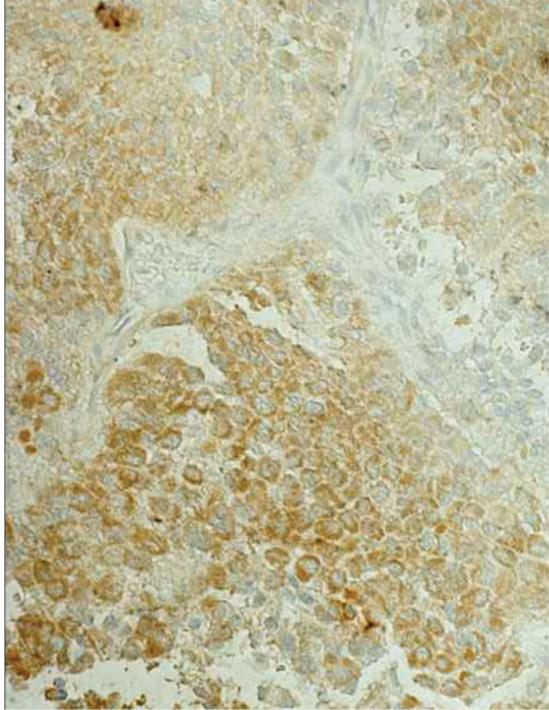


APOPTOSIS. MARCAJE PARA Bcl-2

En la serie de prolactinomas de nuestro estudio, el 75% de los tumores fueron positivos para la proteína antiapoptótica Bcl-2.



La densidad celular positiva dentro de los distintos tumores fue variable. Algunos presentaron en torno a un 50% de sus células positivas a Bcl-2 (imagen superior izquierda); en otros, la práctica totalidad de las células aparecían positivas (imágenes superior derecha e inferior izquierda); mientras que en otros había células positivas aisladas y escasas o bien con una localización intracelular característica (imagen inferior derecha).

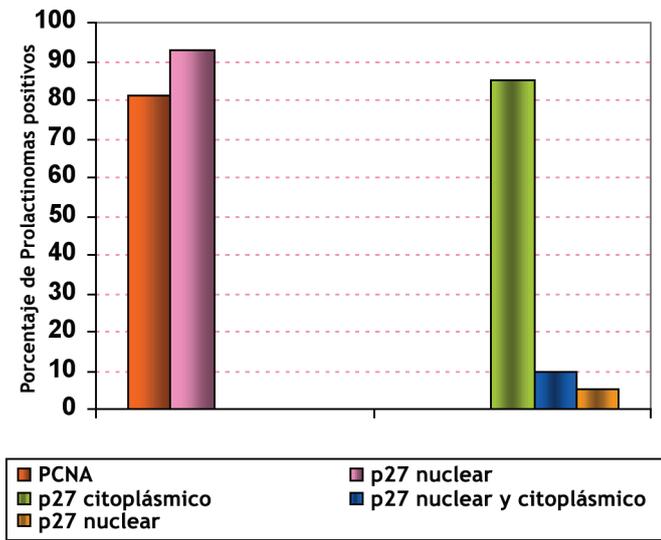


CORRELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS MARCADORES, EN LOS PROLACTINOMAS HUMANOS

Correlación PCNA-p27

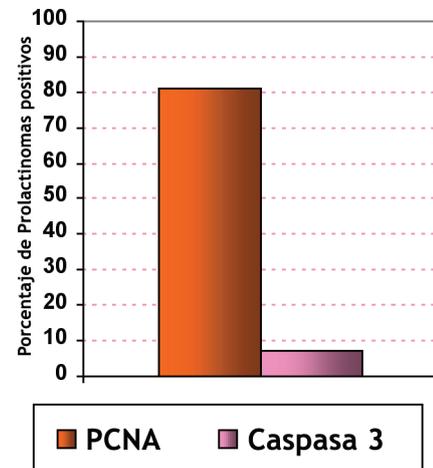
Como puede observarse en la gráfica, dentro de los prolactinomas fue mayor el porcentaje de tumores positivos a p27 que a PCNA.

Sin embargo, la localización intracelular de la reacción demuestra que existe una buena correlación entre la localización exclusivamente citoplásmica de p27 con el marcaje a PCNA. Ningún tumor con localización intranuclear exclusiva de p27 fue positivo a PCNA.



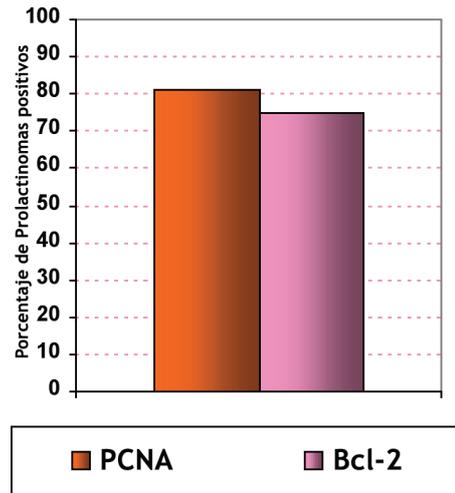
Correlación PCNA-CASPASA 3 activa

La gráfica demuestra como dentro de los prolactinomas fue muy frecuente encontrar tumores altamente proliferativos con marcaje a PCNA y muy raro observar tumores con muchas células en apoptosis positivas a caspasa 3 activa. Nunca observamos tumores con positividad a caspasa 3 activa que a la vez fueron positivos a PCNA.



Correlación PCNA-Bcl-2

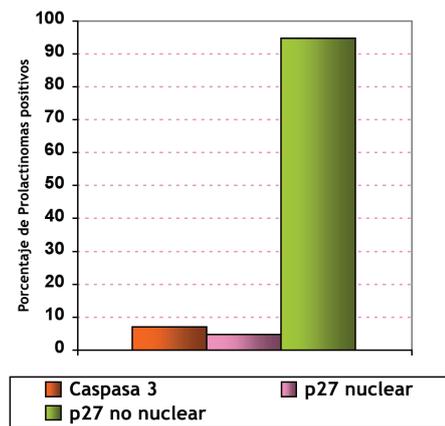
Aunque algún prolactinoma negativo a Bcl-2 fue positivo a PCNA, todos los tumores positivos a Bcl-2 fueron positivos a PCNA.



Correlación CASPASA 3-p27

Como demuestra la gráfica, no hay correlación entre el marcaje citoplásmico para p27 y el marcaje para caspasa 3 activa.

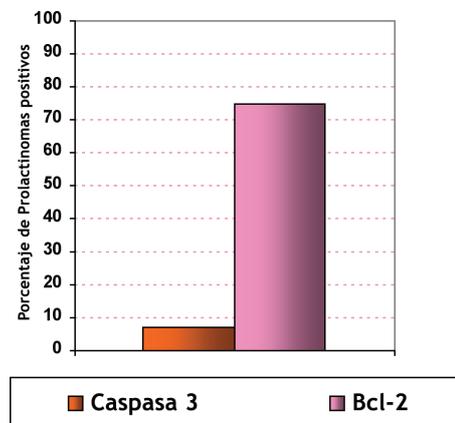
Por el contrario, todos los prolactinomas con marcaje nuclear a p27 fueron positivos a caspasa 3 activa, apareciendo 2 prolactinomas con marcaje nuclear y citoplásmico positivos a la caspasa.



Correlación CASPASA 3-Bcl-2

Aunque no todos los prolactinomas negativos a Bcl-2 fueron positivos a la caspasa 3 activa, lo cierto es que ningún tumor positivo para Bcl-2 fue caspasa 3 activa positivo.

Por otro lado, ningún tumor positivo a la caspasa fue positivo a Bcl-2, o dicho de otra manera, todos los tumores positivos a caspasa 3 activa eran negativos para Bcl-2.



Discusión

Los tumores hipofisarios pueden ser, adenomas y carcinomas. Es cierto que los adenomas son tumores benignos y los carcinomas presentan malignidad y no se sabe si alguno de los adenomas poseen potencial para llegar a ser carcinomas.

Aunque nuestro trabajo está basado en adenomas y sobre ellos centraremos la discusión, no se puede obviar una posible transformación a carcinomas, que incrementaría, aún más, la importancia del conocimiento de la génesis de los adenomas.

Según Asa y Ezzat (1998) y Kovacs y col. (2001) y teniendo en cuenta las características morfológicas y secretoras de la adenohipófisis, se diferencian los siguientes tipos de adenomas, por orden de frecuencia: Prolactinomas (si hay exceso de secreción de hormona prolactina) GHomas o somatotrofinomas (exceso de secreción de hormona GH, unido normalmente a la enfermedad de acromegalia o gigantismo) ACTHomas (unido a la secreción de hormona ACTH en enfermedad de Cushing`s) adenomas no funcionantes (o adenomas que no presentan exceso de secreción de ninguna hormona, ni signos endocrinológicos) y los menos frecuentes, los adenomas que secretan bien TSH, bien gonadotropinas o bien aquellos que secretan más de una hormona. Sin embargo, hemos de decir que los adenomas pituitarios pueden ser muy heterogéneos y con dificultad de tipaje en muchos casos (Kovacs y col., 2001).

La secreción de una determinada hormona por una célula adenohipofisaria, es debida a la existencia de receptores en cada tipo de células maduras de la glándula, que responden a estímulos provocados por hormonas hipotálamicas (hypothalamic-releasing hormones) y neurotransmisores específicos de cada célula y responsables de la secreción hormonal.

En la clasificación de los adenomas antes expuesta, también se ha de tener en cuenta, la llamada secreción paradójica (Cantalamesa y col., 1976; De Marinis y col., 1990). La secreción paradójica es aquella que se produce cuando una célula adenohipofisaria determinada responde a una hormona hipotalámica que no es la específica de dicha célula; ello es debido a que la adenohipofisis contiene, además, algunas células multifuncionales de secreción no ortodoxa y que elaboran dos hormonas adenohipofisarias (células polihormonales) y que responden a varias hormonas hipotalámicas liberadoras (células de múltiple respuesta) y este tipo celular puede estar involucrado en la secreción paradójica y además, en la llamada «*transdiferenciación*» o cambio en el fenotipo celular de estas células, sin que exista división celular (Losa y col., 1985; Cordido y col., 1994; Ámsterdam y col., 1982; Fischer y col., 1992; Villalobos y col., 2004).

Aunque los adenomas se consideran benignos, son causa de una morbilidad importante debido a la invasión local que producen, al hipopituitarismo o, lo contrario, a la hiperestimulación hormonal (Asa y Ezzat, 1998; Kaltsas y Grossman, 1998; Levy y Lightman, 2003; Ragel y Coldwell, 2004; Horvath y Kovacs, 2008).

La iniciación, desarrollo y progresión de los adenomas y su posible paso a carcinomas hipofisarios, no es muy conocida (Donangelo y Melmed, 2008).

Como ha quedado expuesto anteriormente, los tumores hipofisarios, fundamentalmente los adenomas, constituyen entre el 10 y el 15% de todos los

tumores intracraneales (Ishibashi y Yamaji, 1985; Ardí, 1980; Sarkar, 2006). Los prolactinomas son los adenomas más frecuentes y son considerados como tumores monoclonales, que afectan a una sola estirpe celular de la hipófisis, las células de prolactina (Prezant y Melmed, 2002; Clayton y Farrel, 2004) lo que implicaría que pueden existir factores moleculares intrínsecos en las células de prolactina que darían origen al tumor.

Los factores que pueden dar lugar a la génesis de los adenomas en general y de los prolactinomas en particular son múltiples.

Se sabe que, en general, el envejecimiento es causa de la aparición de adenomas; se ha comprobado en ratas viejas, aunque dependiendo de la cepa estudiada, la existencia de adenomas hipofisarios espontáneos en ratas maduras, la mayoría prolactinomas, entre un 10 y un 86% (Sarkar y col., 1983). En nuestro laboratorio hemos encontrado un porcentaje alto de adenomas espontáneos en ratas viejas, siendo la mayoría prolactinomas (Carretero, 2002).

Los E2 han sido muy estudiados como causa de inducción de tumores hipofisarios productores de prolactina (Sadoul y col., 1992). En ratas de ambos sexos, elevados niveles de E2 en suero y durante largos periodos de tiempo, causan hiperplasia y/o adenomas (DeNicola y col., 1978. Wicklund y col., 1981).

En humanos transexuales, que recibieron fuertes dosis de estrógenos, aparecieron prolactinomas (Gooren y col., 1988) y existen evidencias claras de un crecimiento, tanto de micro como de de macroprolactinomas, durante la terapia con estrógenos (Garcia y Kapcala, 1995).

Mujeres que tomaron contraceptivos orales mostraron niveles altos de PRL (Carol y col., 1988) y aquellas que tomaron estrógenos para el tratamiento de irregularidades en la menstruación, la incidencia de prolactinomas fue de 7 a 8 veces más alta (Shy y col., 1983). Estos datos sugieren que

algunas mujeres son más sensibles a los efectos lactogénicos de los estrógenos exógenos y pueden tener más riesgo del desarrollo de prolactinomas (Luciano y col., 1985) lo que sugiere una base génica predeterminante.

Las células de secreción paradójica debido a la transdiferenciación, como antes apuntábamos, pudieran ser un factor de iniciación de los adenomas hipofisarios (Senovilla y col., 2004).

Otro factor a tener en cuenta, es una más de las causas que se señalan, en la génesis de los adenomas, es la angiogénesis (Melmed, 2003; Levy y Lightman, 2003; Scheithauer y col., 2006). Es cierto que la vascularización es menor en los tumores hipofisarios en relación con las hipófisis normales, cosa que no ocurre en otros tipos de tumores, como el de próstata, mama, estómago, donde hay un incremento de la angiogénesis; sin embargo, la vascularización en los adenomas que segregan PRL es más manifiesta que en otros tumores hipofisarios, como los adenomas que producen las hormona GH o FSH (Turner y col., 2003).

Un posible paso de adenomas a carcinomas no es descartado en su globalidad. Si hablamos de la génesis de los carcinomas pituitarios se consideró que los medios terapéuticos empleados para extirpar los adenomas hipofisarios, tales como la hipofisectomía transfrontal o transesfenoidal o la radioterapia, era la causa de dichos tumores; sin embargo, no hay ninguna evidencia que demuestre este punta de vista (Kaltsas y Grossman, 1998; Ragel y Couldwell, 2004; Taylor y col., 1994; Brada y col., 1992).

Una presentación de los carcinomas sin ningún antecedente previo no puede excluirse (Nose-Alberti y col., 1998; Roncaroli y col. 2003); la transformación de los macroadenomas en carcinomas necesita un largo tiempo de evolución (Wilson, 1982; Mountcastle y col. 1989; Pernicone y col., 1997; Kaltsas y Grossman, 1998; LLoyd y col. 2004) con la consecuente aparición de

modificaciones genéticas (Mountcastle y col., 1989; Kaltsas y Grossman, 1998; Ragel y Couldwell, 2004), sabiéndose que en el primitivo estado proliferativo aparezcan mutaciones monoclonales o policlonares y alteraciones de oncogenes, así como de genes supresores de tumores (Kaltsas y Grossman, 1998; Zahedi y col., 2001; Asa y Ezzat, 2002).

Las alteraciones genéticas están involucradas en la génesis y progresión de los prolactinomas, incluyendo la pérdida de genes supresores de tumores, la sobreexpresión de oncogenes y la expresión anormal de proteínas y moléculas intrínsecas, que mantienen la estabilidad de los cromosomas.

En el trabajo que presentamos hemos realizado, con el objeto de poder añadir algún dato nuevo en el conocimiento de la génesis de los prolactinomas, un estudio del comportamiento de diversos factores que intervienen en la proliferación y apoptosis, posiblemente implicados en la génesis de los prolactinomas humanos, relacionándolos entre sí y con la expresión de la enzima aromatasa P450.

Hemos analizado el comportamiento de la Aromatasa en los prolactinomas de nuestra serie; después, para el estudio de la proliferación se ha caracterizado el marcador PCNA o antígeno nuclear de proliferación celular y uno de los factores moleculares que interviene en el ciclo celular, la proteína p27, gen supresor de tumores implicado en el desarrollo de los adenomas pituitarios (Gaffey y col., 2002; Jin, 2003).

Para el estudio de la apoptosis, se ha empleado el marcador apoptótico caspasa 3 activa, así como el análisis de la proteína Bcl-2, considerada como antiapoptótica y que al parecer participa en el desarrollo de los carcinomas pituitarios (Suhardja y col., 2001; Asa y Ezzat, 2002; Turner y col., 2003).

Todos los estudios se hicieron utilizando la técnica inmunocitoquímica, como quedó expuesto en el capítulo de Material y Métodos.

El estudio que presentamos es una parte de otro mas amplio desarrollado dentro de nuestro Departamento, por supuesto con el mismo objetivo, el estudio de la génesis de los prolactinomas humanos; comprende el estudio, entre otros factores, de la expresión de la proteína P53, gen supresor de tumores que está mutado en la mitad de los cánceres humanos (Hollstein y col., 1994) y entre ellos en los carcinomas pituitarios, los adenomas invasivos, aunque no en los adenomas benignos (Hollstein y col., 1994; Pernicone y col., 1997; Gaffey y col., 2002) y se incide mucho más sobre la presencia de aromatasa en los prolactinomas, al ser demostrada mediante hibridación in situ, además de otros factores (Hernández, 2009).

Lo primero que se realizó fue la caracterización de los prolactinomas de nuestra serie de adenomas, mediante inmunocitoquímica.

La mayor parte de los adenomas de nuestra serie fueron caracterizados como prolactinomas.

En efecto, dentro de una serie de 87 adenomas y mediante la demostración inmunocitoquímica de PRL, se demostró que el 55% de ellos (48 tumores) fueron PRL positivos. Previamente, los pacientes habían sido diagnosticados de prolactinoma por sus cifras elevadas de PRL (por encima de 300ng/ml) y los datos clínicos, galactorrea y amenorrea en el caso de las mujeres. El dato concuerda con los hallazgos de otros autores, como ha quedado expuesto y documentado a lo largo de este trabajo.

El segundo punto analizado se refiere a la presencia de aromatasa en sus células y hemos de decir que:

Todos los prolactinomas estudiados fueron aromatasa positivos. Los 48 prolactinomas de nuestra serie, presentaron reacción positiva a la aromatasa, es decir, el 100% de los tumores fueron aromatasa positivos.

Como se ha expuesto en el capítulo de Introducción, existe una clara relación entre aromatasa, testosterona y estrógenos; la actividad de la aromatasa es dependiente de la testosterona lo que conlleva una producción de estrógenos. La testosterona actúa sobre receptores androgénicos (Steimer y Hutchison, 1981; Roselli y col., 1984, 1987; Hutchison y col., 1991b) e induce un aumento de la actividad de la aromatasa conjuntamente con el incremento del número de neuronas hipotalámicas inmunorreactivas al enzima (Dessi-Fulgheri y Lupo, 1982; Hutchison y col., 1995); sin embargo, se ha descrito que la actividad de la aromatasa no se correlaciona completamente con los niveles de testosterona circulante.

Se ha dicho que, dentro del cerebro de los primates, existen dos tipos de neuronas con receptores estrogénicos y en las que la testosterona se convierte en estradiol por acción de la aromatasa. Un tipo neuronal lo constituyen neuronas que captan el estradiol circulante y el otro estaría formado por neuronas que se unen al estradiol producido localmente por la aromatización (Michael y col., 1987; 1989; Clancy y Michael, 1994).

También, estudios realizados en el SNC han demostrado que la respuesta de la aromatasa o de la actividad de la aromatasa a la testosterona circulante no es uniforme, de manera que las neuronas con actividad aromatasa responden o no a la testosterona dependiendo de su localización en el sistema nervioso (Hutchison y col., 1991b). Así, *in vitro*, las neuronas hipotalámicas del ratón presentan una actividad aromatasa mayor en el macho que en la hembra durante el desarrollo pre y perinatal; sin embargo, esa diferencia no existe en las neuronas de la corteza cerebral (Beyer y col., 1993).

También parece claro que existe una regulación exógena, principalmente ejercida por la testosterona, sobre la actividad de la aromatasa en las neuronas diencefálicas de roedores, pues tanto la actividad enzimática (George y Ojeda, 1982; Michnovicz y col., 1987; Lephart y col., 1992a,b), como los niveles del mRNA de la aromatasa (Lephart y col., 1992b; Harada y Yamada, 1992), aumentan en el cerebro de estos animales conforme avanza el desarrollo prenatal, sabiéndose muy poco de los factores que regulan este aumento.

En la hipófisis también existe la enzima capaz de transformar la testosterona en estrógenos. Ha sido aún poco estudiada, pero en nuestro Departamento se ha estudiado la aromatasa en prolactinomas espontáneos de la hipófisis de la rata, encontrando que aquellos que eran prolactinomas puros, todos ellos fueron aromatasa positivos. Además en el mismo trabajo se demostró, utilizando la doble técnica inmunocitoquímica para prolactina y aromatasa, coexistencia total en las células del prolactinoma (Carretero y col., 2002).

En otro trabajo, también en la rata, Carretero y col. (2003) estudiaron la expresión de la aromatasa desde el nacimiento hasta la edad adulta. La expresión de la aromatasa es clara a los 7 días después del nacimiento, no encontrando diferencias entre los machos y las hembras. A los 14 y 17 días sólo decreció en las hembras y no hubo cambios notables en el macho. A los 21 días y a los 2 meses las características siguieron siendo similares. A los 24 meses la reacción en las ratas machos había desaparecido completamente.

Sabiendo que en las células de los prolactinomas existe aromatasa y posiblemente un incremento de estrógenos, es factible que se desencadenen otros factores que actúen en la génesis o desarrollo de las células tumorales, como es el estado proliferativo del tumor.

Para el estudio de la proliferación celular, en nuestro trabajo hemos utilizado el marcador de proliferación PCNA y la expresión de la proteína p27.

Al marcar las células con PCNA, se comprobó que el 70% de los adenomas hipofisarios estudiados presentaron un índice de marcaje a PCNA muy superior al encontrado en hipófisis no tumorales (el límite de proliferación en las hipófisis normales es de un 3% de las células glandulares) y, si éstos eran prolactinomas, el índice de marcaje encontrado fue alto en la mayoría de ellos (81%).

Al utilizar como marcador el PCNA, nos planteamos si la técnica es idónea para el estudio de la proliferación en la hipófisis.

Desde un principio, el análisis de las mitosis celulares es fácil si las mismas se encuentran en metafase de la mitosis dentro del ciclo celular, pero en aquellos órganos como la hipófisis, de baja actividad proliferativa, es difícil el poder observarlas. Se consigue por la acción de sustancias como la colchicina, que alteran el transporte tubular, habiendo sido el primer método utilizado para su estudio (Pomerat, 1941; Hunt, 1943; Nouët y Kujas, 1975).

Años más tarde comenzó a utilizarse la timidina tritiada para el estudio de la proliferación. La timidina radiactiva es detectada mediante autorradiografía, después de que la misma se haya interiorizado en el núcleo durante la fase S del ciclo celular; en la hipófisis ha sido ampliamente utilizada (Hunt y Hunt, 1966; Crane y Loomes, 1967; Mastro y col., 1969; Goluboff y col., 1970; Städtler y col., 1970). Como técnica tiene algunas desventajas, como son, el ser una técnica radiactiva y el tener que esperar días o semanas para su observación y estudio.

Con esta técnica, Nouët y Kujas, (1975) encuentran niveles bajos de actividad mitótica en células adultas hipofisarias; sin embargo, comprobaron cambios diurnos en los niveles de actividad, con un pico de mas actividad a las 6 a.m.; a estos datos hay que añadir que los estudios se hicieron entre las 9-11 horas a.m. que son momentos de baja actividad, según estos estudios. Sin embargo, cambios diurnos es claro que existen.

Más tarde, se han utilizado otras técnicas como la de la Bromodeoxiuridina (BrdU) o empleando el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Oishi y col (1993), demostraron que los niveles proliferativos, en ratas adultas, eran bastante más altos que los demostrados por las técnicas anteriores.

Gratzner (1982) utilizó un análogo de la timidina, la bromodeoxiuridina (BrdU) para estudiar la actividad proliferativa. Esta sustancia se incorpora al núcleo en fase S del ciclo celular y se puede detectar mediante inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal contra ella. Es una técnica, muy positiva, da resultados excelentes y puede ser aplicada en muchas células y tejidos.

Watanabe y Carbajo-Pérez (1990) estudiaron mediante esta técnica la proliferación en las hipófisis, encontrando una amplia proliferación en ratas hembras en las células de PRL in vitro. Del mismo modo, utilizando esta técnica, Jones y col. (1994) estudian la proliferación en las células de la pituitaria, después de la administración de fenobarbital.

Kurosumi y Kobayashi (1966) y Kurosumi (1971, 1979) observaron mitosis en las células de la pituitaria utilizando microscopía electrónica; pero son los estudios de Oishi y col., (1993) los que han detallado más esta actividad proliferativa usando la técnica de la BrdU, encontrando los siguientes datos en relación con las células de PRL; encuentran que un 60% de las células que presentan actividad proliferativa son células de PRL en las hembras en proestro, mientras que este porcentaje baja al 40% en los machos.

Takahashi y col (1984) Takahashi y Kawashima (1987) Takahashi (1995) encontraron que la actividad mitótica de ratas era de un 10-15% y estos datos se incrementaban hasta el 70% durante el estro, mientras que en los machos era de un 20%.

La otra técnica, consistente en utilizar el marcador PCNA o antígeno nuclear de proliferación celular, es la utilizada por nosotros.

Numerosos trabajos avalan la utilidad de este antígeno para demostrar la proliferación celular (Nakane y col., 1989; Landberg y Ross, 1991; Nakajima y col, 1994; Ezaki y col. 1995) y en nuestro laboratorio ha sido utilizada en diversas circunstancias (Carretero y col., 1995; 1996; 1999; 2006), algunos autores, como Coltrera y Grown (1991); Connolly y Bogdanffy (1993); Elsasser y col. (1994); Atkiny col. (1997) creen que los resultados con este método deben tomarse con precaución pues la expresión de la PCNA no es exclusiva de la fase S del ciclo celular. En contraste, Oishi y col. (1993) y Taniguchi y col. (2001) aplican este método en la hipófisis de la rata para estudiar la proliferación y llegan a la conclusión de que la PCNA es un método muy sensitivo en el estudio de la proliferación.

La causa por la que la actividad proliferativa esté incrementada en los prolactinomas no es conocida.

En la hipófisis, la actividad proliferativa se mantiene constante excepto en la época de crecimiento, en la que se aprecia una disminución progresiva (Nouët y Kujas, 1975; Shirisawa y Yoshimura, 1982; Sakuma y col., 1984; Car-bajo-Perez y Watanabe, 1990).

Sin embargo, al parecer de Oishi y col. (1993) la actividad proliferativa guarda relación con los ritmos circadianos, el ciclo estrual y el sexo; también se ha observado que es mayor la actividad proliferativa en la rata hembra que en el macho, por lo que dependería del sexo.

Al parecer es mayor la actividad proliferativa en la rata a primeras horas de la mañana y a media noche, sobre el resto del día, lo que implica, según Nouet y Kujas (1975), la participación de los ritmos circadianos en este proceso.

El mismo autor antes citado y Hunt y Hunt (1966) comprobaron que la actividad proliferativa dependía de la fase del ciclo estrual; iba en aumento desde el proestro hasta el estro, disminuyendo progresivamente desde el final del estro, metaestro y diestro; desde el metaestro hasta el proestro no hay cambios significativos.

Estos cambios son debidos a los niveles de estradiol que tiene lugar en el ciclo estrual, ya que el estradiol actúa como agente favorecedor de la proliferación (Oishi y col.1993).

El exceso de estrógenos es causa de hiperplasia hipofisaria (Horvath y col., 2001), sin embargo no hay evidencia de que la propia hiperplasia sea causa del desarrollo del adenoma, pues después de la hiperplasia producida por la gestación y lactancia no incrementa la aparición de prolactinomas (Cogan y col., 1995) o bien la administración de estrógenos de manera continua no siempre desarrolla adenomas (Ghannam y col.1999; Kovacs y col.1994), aunque hay casos en los que sí se producen (Heaney y col. 1999).

Los E2 actúan como potentes mitógenos sobre las células lactotropas (Deneb, 2003; Takahashi, 2004); la acción no parece ser un efecto directo de los estrógenos sobre las células, sino más bien que depende de factores hipotalámicos y de agentes locales.

La acción estrogénica puede ser parcialmente ejercida por el efecto inhibidor del factor hipotalámico inhibidor de dopamina, potente inhibidor de la proliferación de las células lactotropas; en efecto, la dopamina, a través de la isoforma corta del receptor D2, reduce la proliferación lactotropa induciendo la expresión de un factor de crecimiento antiproliferativo, el *transforming growth factor-b1* (TGF-b1) y su receptor TGF-b1 tipo II (Sarkar y col., 2005).

Los estrógenos aumentan la actividad mitótica de la adenohipófisis (Lloyd y col.1975; Jacobi y col.1977; Kalbermann y col.1979) y es factible que la proliferación de las células de prolactina durante el estro sea estimulada por la elevada secreción de estrógenos ováricos durante el proestro (Oishi y col.1993).

Los estrógenos están asociados a estas acciones proliferativas en las células lactotropas, aunque también pueden ejercer efectos antiproliferativos, por ejemplo, los E2 añadidos a cultivos de células de la adenohipofisis durante 72 horas reducen la acción mitógena de la Insulina y IGF-1 en las células lactotropas (Missale y col., 1998, Gutierrez y col., 2005).

Otros hallazgos han sugerido que el efecto proliferativo de los E2 sobre las lactotropas se debe a efectos paracrinos (Oomizu y col., 2004). Aunque el 2,5% de las células lactotropas proliferan en el estro (Hashi y col. 1995) hay que pensar que el mismo número de células pueden morir para mantener el número de la subpoblación de este tipo celular. Aunque el número de células que proliferan en cada ciclo es pequeño, una desregularización de este proceso puede tener consecuencias en la homeostasis tisular de las hembras que están en fase del ciclo estrual.

En relación con la proliferación, hemos estudiado un factor molecular que interviene en ciclo celular, concretamente la proteína p-27.

En nuestro trabajo hemos comprobado que:

Los prolactinomas presentaron un índice de positividad alto frente a la proteína p27, pues el 92,73% dieron positivos a esta proteína; sin embargo existió una discreta dispersión en cuanto al lugar de la célula donde apareció la proteína; en la mayoría de los tumores estuvo localizada en el citoplasma (85%) en un 10% en el citoplasma y en el núcleo y, en un 5% sólo en el núcleo.

La proteína p27, entre otros factores, se considera de algún modo implicada, como factor proliferativo.

La proteína p27, gen supresor de tumores, está implicado en el desarrollo de los adenomas pituitarios, impidiendo la proliferación (Gaffey y col. 2002; Jin, 2003). Participa en el control del ciclo celular, en las fases G1 a S y en pasar a la célula a la fase G0.

El paso de G1 a S está en relación con la activación de los complejos cdk-ciclinas, como quedó expuesto en el capítulo de Planteamiento y una falta de equilibrio entre estos complejos y la proteína p27, está presente en los adenomas hipofisarios, según Donangelo y Melmed (2008).

Disregulaciones en el patrón de expresión de p27, concretamente aquellas que conducen a una represión transcripcional, están relacionadas con fenómenos de progresión tumoral (Jackson y col. 2002; Musgrove y col. 2004). Es por esto que p27 se considera como proteína supresora de tumores y su utilidad como marcador con valor pronóstico ha sido intensamente estudiada. La localización subcelular de p27 es también un factor estudiado en laboratorios anatomopatológicos, considerándose la situación citosólica como un marcador de mal pronóstico (Alkarain y col. 2004).

En relación con la proteína p27 se encuentra otra proteína la p53 que ha sido estudiada en nuestro Laboratorio, en un trabajo complementario con el nuestro (Hernández, 2009). la proteína p53 es un gen supresor de tumores que está mutado en la mitad de los canceres humanos (Hollstein y col., 1994) y entre ellos, en los carcinomas pituitarios, los adenomas invasivos, aunque no en los adenomas benignos (Hollstein y col., 1994; Pernicone y col., 1997; Gaffey y col., 2002).

En nuestro trabajo, otros factores analizados guardan relación con la apoptosis. En concreto se trata del estudio de la apoptosis mediante el análisis inmunocitoquímico de la Caspasa 3 activa y de la proteína antiapoptóticas Bcl-2.

El porcentaje de células en apoptosis en los prolactinomas fue muy bajo, ya que solo el 7% de los estudiados resultó presentar reactividad citoplásmica, siendo esta reactividad muy desigual en cuanto a intensidad de reacción se refiere.

Si la apoptosis es analizada comprobando el comportamiento de la proteína antiapoptóticas Bcl-2, la positividad, aunque alta, solo alcanzó al 75% de los prolactinomas

Las células de los prolactinomas fueron en gran parte positivas a la proteína Bcl-2, apareciendo en un número variable de estas células, desde un 100% hasta ser escasas y muy individualizadas.

La muerte celular programada o apoptosis ha podido ser estudiada gracias a la existencia de modelos de animales experimentales (Drewett y col., 1993; Yin y col., 1994; Srikant 1995) que han permitido apreciar en la hipófisis los efectos de la manipulación hormonal.

Para el estudio de la apoptosis en los tumores hipofisarios (adenomas y carcinomas) se están empleando un buen número de técnicas de tipo morfológico (para detalles ver trabajo de Kulig y col., 1999). En un principio sólo se utilizaban los métodos de microscopía óptica, analizando las características histológicas del tejido y la microscopía electrónica, para poder ver cuerpos apoptóticos y otros cambios ultraestructurales asociados con la apoptosis.

En secciones de parafina se analizó mediante el método de marcaje in situ del DNA fragmentado o técnica de TUNEL (Terminal *dioxynucleótido transferasa-mediated dUTP nick-end labeling*) cuyo fundamento es la detección de la rotura del DNA internucleosomal (final de la apoptosis), detectando la apoptosis en estadios mas precoces que con la hematoxilina eosina. Se basa

en la incorporación de un oligonucleótido marcado con fluorescencia, permitiendo la localización y cuantificación de núcleos fragmentados.

La inmunocitoquímica está siendo ampliamente utilizada para analizar la expresión de determinadas proteínas reguladoras del proceso, como la presencia o no de caspasa 3 activa o las variaciones de la proteína Bcl-2, por citar aquellos marcadores por nosotros utilizados.

En la hipófisis humana y concretamente en los adenomas, la muerte programada ha sido menos estudiada (Kontogeorgos y col., 1997; Green y col., 1997); se sabe que en los adenomas hipofisarios y más aun en los carcinomas, existe un índice apoptótico alto (Kulig y col., 1999). Ver trabajo de Kaltas y col. (2005) para más detalles.

La apoptosis es frecuente observarla en células hormono-dependientes, sobre todo después de una deprivación hormonal (Schwartzman y Cidlowski, 1993; Vaux y Strasser, 1996; Thompson, 1994).

En hipófisis humanas de mujeres preñadas y después del parto presentaron índices apoptóticos cuatro y cinco veces más altos que los controles. La hipófisis aumenta en peso entre el 80% y el 100% en mujeres preñadas, secundaria a la hiperplasia de células de prolactina (Stefaneanu y col.1992).

En animales, durante el posparto, se ha demostrado que existen índices elevados de apoptosis (Haggi y col.1986; Ahlbom y col.1998) siendo estos hallazgos similares a los encontrados después de un tratamiento con estrógenos (Drewet y col., 1993) en ratas, donde se apreciaron tanto células apoptóticas como otras células presentando cuerpos apoptóticos fagocitados, incrementadas después de un periodo de 44 horas de dejar el tratamiento estrogénico.

Durante el ciclo estrual, el nivel de apoptosis se correlaciona con los niveles sanguíneos de E2 (Yin y Arita, 2002). Para Radl y col (2008) la DA induce apoptosis sólo en presencia de E2, lo que sugiere que es necesario una estimulación previa por E2 para que se desarrolle el efecto inhibitor de DA.

Es conocido que los E2 incrementan la sensibilidad en las células de la adenohipófisis ante diferentes estímulos apoptóticos (Candolfi y col., 2004; Jaita y col., 2005; Pisera y col., 2004). También se ha demostrado que el *lipopolisacárido inductor de apoptosis* en la adenohipófisis es más alto en proestro que en otras fases del ciclo (Pisera y col., 2004) aunque ello no ocurra en las células lactotropas.

El gen Bcl-2 es otra de las proteínas que se esta estudiando en la actualidad en la participación del desarrollo de los carcinomas pituitarios (Suhardja y col. 2001; Asa y Ezzat, 2002; Turner y col., 2003).

La familia de proteínas Bcl-2 regulan, tanto estimulando como frenando, diversos pasos en la apoptosis. La propia Bcl-2, componente de esta amplia familia, bloquea la muerte celular (Reed, 1994; Yang y Korsmeyer, 1996).

Una sobreexpresión de Bcl-2 ha sido demostrada en un 30% de los adenomas estudiados por Wang y col (1996); sin embargo, otras proteínas, tanto proapoptóticas como antiapoptóticas de esta familia, no han sido estudiadas.

Se admite que la sobreexpresión de Bcl-2 provoca protección contra varios estímulos proapoptóticos, como los provocados por la proteína p53, las radiaciones y la quimioterapia (Schwartzman y Cidlowski, 1993; Vaux y Strasser, 1996; Thompsom, 1994).

Kulig y col. (1999) estudiando hipófisis humanas no tumorales y neoplásicas encontraron niveles bajos de apoptosis, en estudios in vivo, en adeno-

mas hipofisarios realizados mediante la técnica TUNEL; solo en algunos casos hallaron signos de apoptosis, concretamente condensación de la cromatina nuclear y cuerpos apoptóticos; sin embargo, los niveles de apoptosis en los carcinomas fueron más elevados.

Mediante técnicas inmunocitoquímicas, los autores antes citados mostraron, en cortes de parafina de adenomas hipofisarios, concentraciones altas de Bcl-2, pero no en los carcinomas.

La familia Bcl-2 activa la apoptosis vía retículo endoplásmico (Zong y col., 2003) y al parecer, pueden actuar regulando el movimiento de los iones de calcio a través de las membranas del retículo endoplásmico, aboliendo la señal del calcio para la apoptosis (Lam y col., 1994).

Los índices de apoptosis encontrados por (Green y col., 1997; Saitoh y col., 1997) y por Kulig y col. (1999) fueron significativamente bajos en relación con los encontrados por Kontogeorgos y col. (1997) estudiando 85 adenomas hipofisarios humanos, donde los índices de apoptosis fueron más altos. Estas discrepancias pueden ser debidas a la técnica empleada para detectar las células en apoptosis, en cada trabajo.

También se sabe que, en los adenomas hipofisarios y más aún en los carcinomas existe un índice apoptótico alto (Kulig y col., 1999). Ver trabajo de Kaldas y col., 2005.

También hemos estudiado la apoptosis utilizando el marcador caspasa 3 activa.

Según nuestros resultados, la mayoría de los prolactinomas fueron caspasas 3 negativos y, tan solo un 7% presentaron positividad.

Las caspasas están agrupadas en tres subfamilias, estando las caspasa 3 activa en la subfamilia símil- CPP32. La caspasa 3 activa interviene en la degradación de varias proteínas citoplásmicas y nucleares que inducen la degradación de DNA. La forma inactiva de la caspasa 3 se encuentra en la mitocondria y citoplasma, mientras que la forma activa se localiza en el citoplasma y en el núcleo (Mancini y col., 1998; Samali y col., 1998; Lavrik y col., 2005).

Esta caspasa 3 activa puede ser demostrada, al disponer de anticuerpos específicos, por métodos inmunocitoquímicos y aplicados en piezas incluidas en parafina (ver trabajo de Huppertz y col., 1999) este método ha sido utilizado por nosotros en este trabajo.

No hemos encontrado trabajos que analicen en prolactinomas humanos este marcador como dato en el proceso tumoral; solamente se citan las caspasas en general como elementos que intervienen y son fundamentales en el proceso de apoptosis y que la apoptosis juega un papel preponderante en la oncogénesis hipofisaria (Green y col., 1997; Kulig y col., 1999; Ozer y col., 2003; Sambaziotis y col., 2004; Kontogeorgos, 2005, 2006).

Por último hacemos algunas consideraciones en cuanto a correlaciones existentes entre los prolactinomas, aromatasa positivos y el resto de factores analizados:

Todos los prolactinomas fueron aromatasa positivos y se puede decir que el porcentaje de los tumores con células en proliferación o PCNA positivos fue alto.

Los prolactinomas, aromatasa positivos y con índice de proliferación alto presentaron un porcentaje bastante alto pero no total, con la proteína p27; la correlación fue concordante total (porcentaje alto) cuando se tuvo en cuenta la presencia de proteína p27 en el citoplasma, no existiendo presencia de p27 nuclear o nuclear y citoplásmica.

Los prolactinomas, aromatasa positivos y con índice de proliferación alto, presentaron pocas células en apoptosis, demostrada por la caspasa 3 activa.

Los prolactinomas, aromatasa positivos y con índice de proliferación alto, fueron claramente positivos a la proteína antiapoptótica Bcl-2.

Los pocos prolactinomas, aromatasa positivos, con índice de proliferación bajo y caspasa 3 activa positiva, fueron negativos a la proteína antiapoptótica Bcl-2.

Los prolactinomas aromatasa positivos, con la proteína p27 positiva en el núcleo, fueron negativos a la caspasa 3 activa.

Todas estas relaciones tienen congruencia excepto la expresión de la proteína 27; en efecto, esta proteína p27 está presente en los prolactinomas y por tanto debería frenar el aspecto proliferativo del tumor, al ser la proteína un factor antiproliferativo y considerado dentro de los genes supresores de tumores. Tan sólo podemos decir que la presencia de esta proteína fue fundamentalmente citoplásmica (85%) y mucho menos nuclear (5%) y que su acción es efectiva a nivel nuclear.

Para concluir esta discusión hemos de hacer referencia a que la Aromatasa p450 está presente en todos los prolactinomas y que su presencia debe guardar relación con la producción de E2 por aromatización de la testosterona. Que los cambios que se producen en las células lactotropas de estos adenomas presentan modificaciones que demuestran que existe proliferación y apoptosis en estos tumores, con bastante interrelación entre ellos, salvo la proteína p27 que, debiendo estar disminuida, está, por el contrario, aumentada, aunque sea sólo a nivel citoplásmico.

Conclusiones

Después de haber realizado un estudio sobre prolactinomas humanos en el que se han analizado factores de proliferación y apoptosis, correlacionándolos con la presencia de aromatasa en las células tumorales, hemos llegado a las conclusiones siguientes:

1. Las células de prolactina presentes en los prolactinomas humanos presentaron una reacción positiva a la aromatasa, es decir, los prolactinomas son aromatasa positivos.
2. El índice de proliferación de los prolactinomas humanos, aumenta considerablemente en relación con las hipófisis humanas no tumorales.
3. La apoptosis existente en las células de los prolactinomas humanos, demostrada mediante el estudio de la caspasa 3 activa, es poco frecuente, pudiendo afirmarse que ninguno de los tumores que presentaron proliferación a PCNA demostraron poseer caspasa 3 activa.
4. La mayoría de los prolactinomas humanos que presentaron índices de actividad proliferativa elevados presentaron una actividad positiva frente a la proteína antiapoptótica Bcl-2.
5. La expresión de proteína p27 reguladora del ciclo celular y considerada como antiproliferativa, se expresó prácticamente en todos los prolac-

tinomas estudiados, si bien, su presencia se evidenció fundamentalmente en el citoplasma y escasamente a nivel nuclear.

6. Los prolactinomas, con índice de proliferación alto y aromatasa positivos, no presentaron células en apoptosis, caspasa 3 activa positivas.
7. Todos los prolactinomas, con índice de proliferación alto y aromatasa positivos, con marcaje nuclear positivo a p27, fueron negativos a caspasa 3 activa, sucediendo lo mismo con marcaje citoplásmico y nuclear de la p27; sin embargo, si hubo correlación entre la caspasa 3 activa y la expresión citoplásmica de p27.
8. En los prolactinomas, con índice de proliferación alto y aromatasa positivos, aunque no todos los que fueron negativos a Bcl-2 fueron positivos a la caspasa 3 activa, lo cierto es que, ningún tumor positivo a Bcl-2 fue caspasa 3 positivo.

Bibliografía

- Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281: 1322-1326. Review.
- Aguirre A. Guía practica del ciclo celular y mitosis. 2000. Norma. Cali. 8 ed. 651-676.
- Ahlbom E, Grandison L, Zhivotovsky B, Ceccatelli S. 1998. Termination of lactation induces apoptosis and alters the expression of the Bcl-2 family members in the rat anterior pituitary. *Endocrinology*. 139: 2465-2471
- Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. 2004. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*. 9: 67-80
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87: 171
- Amsterdam JD, Winokur A, Lucki I, Snyder P, Harris RI, Caroff S, Rickels K. 1982. Growth hormone, prolactin and thyrotropin responses to gonadotropin-releasing hormone in depressed patients and healthy volunteers. *Psychoneuroendocrinology*. 7: 177-84.
- Andrés V, Díez-Juan A. 2002. Papel del inhibidor del ciclo celular p27 durante el remodelado vascular. *Nefrología*. 22: Supp5. 17-20
- Aron DC, Howlett TA. 2000. Pituitary incidentalomas. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 29: 205-21. Review.
- Asa SL. 1997. Tumors of the pituitary gland, 3rd. edition. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC.
- Asa SL, Ezzat S. 2002. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat. Rev. Cancer*. 2: 836-849.

- Asa SL, Ezzat V. 1998. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr. Rev.* 19: 798-827..
- Asa SL, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ. 1999. Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology.* 140: 5348-5355.
- Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signalling and modulation. *Science.* 281: 1305-1308.
- Atkin SL, Green VL, Hipkin LJ, Landolt LM, Foy PM, Jeffreys RM, White MC. 1997. A comparison of proliferation indices in human anterior pituitary adenomas using formalin-fixed tissue and in vitro cell culture. *J. Neurosurg.* 87: 85-88
- Balthazart J, Foidart A, Surlemont C, Harada N. 1991a. Distribution of aromatase-immunoreactive cells in the mouse forebrain. *Cell. Tissue. Res.* 263: 71-79
- Balthazart J, Foidart A, Surlemont C, Harada N. 1991b. Neuroanatomical specificity in the co-localization of aromatase-and estrogen receptors. *J. Neurobiol.* 22: 143-157
- Barr PJ, Tomei LD. 1994. Apoptosis and its role in human disease. *BioTechnology* 12: 487-93
- Benarroch EE, Daube JR, Flemming KD, Westmoreland BF. 2008. Mayo clinic medical neurosciences organized by neurologic systems and levels. Fifth Edition. Mayo clinic scientific press.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.* 22: 724-763.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 17: 639-69.
- Bentle MS, Reinicke KE, Bey EA, Spilz DR, Boothman DA. 2006. Calcium-dependent modulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 281: 33684-31969.
- Byrne JV. 2008. Imaging of the pituitary and hypothalamus. En: *Clinical endocrine oncology.* Hay ID, Wass JAH. Eds. Blackwell Publishing.

- Beyer C, Green SJ, Barrer PJ, Huskinsson NS, Hutchinson JB. 1994b. Aromatase immunoreactivity is localised specifically in neurons in the developing mouse hypothalamus and cortex. *Brain. Res.* 638: 203-210
- Beyer C, Morali G, Larsson K, Söderstein P. 1976. Steroid regulation of sexual behavior. *J. Steroid. Biochem.* 7: 1171-1176.
- Beyer C, Tramonthe R, Hutchison RE, Sharp PJ, Barker PJ, Huskinsson NS, Hutchison JB. 1994c. Aromatase immureactive neurons in the adult female chicken detected using a especific antibody. *Brains. Ress. Bull.* 33: 583-588
- Beyer C., Wozniak A, Hutchinson JB. 1993. Sex-specific aromatization of testosterone in mouse hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology.* 58: 673-681.
- Bitran D, Hull EM, Holmes GM, Lookingland KJ. 1988. Regulation of male rat copulatory behaviour by preoptic incertohypothalamic dopamine receptors. *Brain. Res. Bull.* 20: 323-331.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA. dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65: 135-172.
- Boticario C, Cascales M. 2008. Innovaciones en cáncer. UNED Varia Eds.
- Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD. 2005. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115: 2640-2647.
- Brada M, Ford D, Ashley S, Bliss JM, Crowley S, Mason M, Rajan B, Traish D. 1992. Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *Br. Med. J.* 304: 1343-1346
- Burgués Gasió JP, Pontones Moreno JL, Vera Donoso CD, Jiménez Cruz JF, Ozonas Moragues M. 2005. Cell cycle and apoptosis mechanisms implicated in intravesical chemotherapy resistances in superficial bladder cancer. *Actas urológicas españolas.* 29: 846-859.
- Callard GV, Pudney JA, Kendall SL, Reinboth R. 1984. In Vitro conversión of androgen to estrogen in amphioxus gonadal tisúes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56: 53-58.
- Candolfi M, Jaita G, Pisera D, Ferrari L, Barcia C, Liu C, Yu J, Liu G, Castro MG, Seilicovich A. 2006. Adenoviral vectors encoding tumor necrosis

- factor- α and FasL induce apoptosis of normal and tumoral anterior pituitary cells. *J. Endocrinol.* 189: 681-690.
- Candolfi M, Jaita G, Zaldivar V, Zarate S, Pisera D, Seilicovich A. 2004. Tumor necrosis factor- α -induced nitric oxide restrains the apoptotic response of anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology.* 80: 83-91.
- Candolfi M, Zaldivar V, De Laurentiis A, Jaita G, Pisera D, Seilicovich A. 2002. TNF- α induces apoptosis of lactotropes from female rats. *Endocrinology.* 143: 3611-3617.
- Cantalamessa L, Reschini E, Catania A, Giustina G. 1976. Pituitary hormone responses to hypothalamic releasing hormones in acromegaly. *Acta. Endocrinol. (Copenh).* 83: 673-683.
- Carbajo-Perez E, Watanabe YG. 1990. Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell. Tissue. Res.* 261: 333-338
- Carol W, Lauterbach H, Klinger G, Unger A, Michels W. 1988. Prolactin stimulation using the metoclopramide test in females taking oral contraceptives. *Zentralbl. Gynakol.* 110: 1515-1521.
- Carretero J, Rubio M, Navarro N, Prieto P, Vázquez RJ, Sánchez F, Vázquez R. 1955. In vitro modifications in the proliferation rate of prolactin cells are accompanied by nuclear morphometric variations. *Histol Histopathol.* 10: 135-139.
- Carretero J, Vázquez RJ, Santos M, Cacicedo L, Rubio M, Sánchez-Franco MF, Vázquez R. 1996. Dopamine inhibits in vitro release of VIP and proliferation of VIP-immunoreactive pituitary cells. *Neuropeptides.* 30: 81-86.
- Carretero J, Martín Clavijo A, Vázquez G, Somalo J, Rubio M, Sánchez F, Hernández E, Montero MC, Torres JL, Vázquez R. 1999. Effects of in vitro immunosuppression of Interleukin-6 on the proliferation of rat hypophyseal cells. *Eur. J. Anat.* 3: 137-143.
- Carretero J, Burks DJ, Vázquez G, Rubio M, Hernández E, Bodego P, Vázquez R. 2002. Expression of aromatase P450 is increased in spontaneous prolactinomas of aged rats. *Pituitary.* 5: 5-10.
- Carretero J, Vázquez G, Martín-Clavijo A, Rubio M, Hernández E, Moro JA, Gato A, Barbosa E, Vázquez R. 1999. In vivo studies on cytodifferenti-

- ation of pituitary aromatase-immunoreactive cells. *Eur. J. Anat.* 3: 79-85.
- Carretero J, Vázquez G, Rubio M, Blanco E, Juanes JA, Pérez E, Burks DJ, Vázquez R. 2003. Postnatal differentiation of the immunohistochemical expresión of aromatase P450 in the rat pituitary gland. *Histol. Histopathol.* 18: 419-423.
- Carretero J, Vázquez RJ, Rubio M, Santos M, Vázquez G, Sánchez F, Blanco E, Martín-Clavijo A, Vázquez R. 1998. Inverse effects of estradiol and testosterona on the in vitro proliferation rate of rat VIP-immunoreactive pituitary cells. *Eur. J. Anat.* 2: 101-108
- Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. 1990. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr. Rev.* 11: 201-220.
- Celis J, Bravo R. 1984. Synthesis of the nuclear protein cyclin in growing, senescent and morphologically transformed human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* 165: 21.
- Chang XT, Kobayashi T, Kajiura H, Nakamura M, Nagahama Y. 1997. Isolation and characterization of cDNA encoding the tilapia (*Oereochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase: Changes in P450 aromatase mRNA. Protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* 18: 57-66.
- Charvin D, Vanhoutte P, Pages C, Borrelli E, Caboche J. 2005. Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 12218-12223.
- Chen S, Shively JE, Nakajin S, Shinoda M, May PF. 1986. Aminoterminal sequence analysis of human placenta aromatase. *Biochen. Biophys. Res. Commun.* 135: 713-719.
- Chen J, Wersinger C, Sidhu A. 2003. Chronic stimulation of D1 dopamine receptors in human SK-N-MC neuroblastome cells induces nitric-oxide synthase activation and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 278: 28089-28100.
- Ciccarelli A, Daly AF, Beckers A. 2005. The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary.* 8: 3-6.

- Clancy AN, Michael RP. 1994. Effects of testosterone and aromatase inhibition on estrogen receptor-like immunoreactivity in male rat brain. *Neuroendocrinology*. 59: 552-560.
- Clark PM, Neylon I, Raggatt PR, Sheppard MC, Stewart PM. 1998. Defining the normal cortisol response to the short Synacthen test: implications for the investigation of hypothalamic-pituitary disorders. *Clin. Endocrinol*. 49: 287-292.
- Clayton RN, Farrell WE. 2004. Pituitary tumour clonality revisited. *Front. Horm. Res*. 32: 186-204.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J*. 326: 1-16.
- Coltrera MD, Grown AM. 1991. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. *J. Histochem*. 39: 23-30
- Conley AJ, Walters KW. 1999. Aromatization. *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1. Pp. 280-291. Academic. Press.
- Connolly KM, Bogdantty MS. 1993. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *J. Histochem. Cytochem*. 41: 1-6
- Coogan PF, Baron JA, Lambe M. 1995. Parity and pituitary adenoma risk. *J. Natl. Cancer. Inst*. 87: 1410-1411
- Cooper GM. 1999. *The cell, a molecular approach*. Washington, ASM. Dress and Sinahuer Associated Inc. 1191-1205.
- Cordido F, Casanueva F, Vidal O, Diéguez C. 1994. Physiopathology of hypophyseal tumors secreting growth hormone, prolactin and glycoproteins. *An. Med. Interna*. 11: 89-94.
- Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. 1990. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer. Res*. 10: 1153-1159.
- Crane WAJ, Loomes RS. 1967. Effect of age, sex, and hormonal state on tritiated thymidine uptake by rat pituitary. *Br. J. Cancer*. 21: 787-792

- Cruz M, Canario AVM. 2000. cDNA cloning and expression of brain and ovary aromatase in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. 6th International Symposium on the reproductive physiology of fish. (Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, eds.) Pub. Univ. Bergen (Norway). p 193.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116: 205-219.
- Davis EC, Shryne JE, Gorski RA. 1996. Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology*. 63: 142-148.
- De Bold JF, Clemens LG. 1978. Aromatization and the induction of male sex behaviour in male, female, and androgenized female hamsters. *Horm. Behav.* 11: 401-413.
- De Marinis L, Manzini A, Zuppi P, Anile C, Maira G. 1990. Paradoxical growth hormone response to thyrotropin-releasing hormone in acromegaly. Clinical correlations and prognostic value. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 122: 443-449.
- De Nicola AF, von Lawzewitsch I, Kaplan SE, Libertun C. 1978. Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. *J. Natl. Cancer. Inst.* 61: 753-763.
- Deneb C. 2003. Paracrine control of lactotrope proliferation and differentiation. *Trends. Endocrinol. Metab.* 14: 188-195.
- Dessi-Fulgheri F, Lupo C. 1982. Odour of male and female rats changes hypothalamic aromatase and 5 α -reductase activity and plasma sex steroid levels in unisexually reared male rats. *Physiol. Behav.* 28: 231-235
- DeWolf WC, Gastón SM. 2004. The cell cycle and its relevance to the urologist. *J. Urol.* 171: 1274-1281
- Donangelo I, Melmed S. 2008. Molecular pathogenesis of pituitary adenomas. En: *Clinical endocrine oncology*. Hay ID, Wass JAH, Eds. Blackwell Publishing.
- Drewett N, Jacobi JM, Willgoss DA., Lloyd HM. 1993. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology*. 57:89-95

- Ellis HM, Horvitz HR. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-829.
- Elsasser HP, Biederbick A, Kern HF. 1994. Growth of rat pancreatic acinar cells quantitated with a monoclonal antibody against the proliferating cell nuclear antigen. *Cell. Tissue. Res.* 276: 603-609
- Ezaki T, Yao L, Matsuno K. 1995. The identification of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) on rat tissue cryosections and its application to double immunostaining with other markers. *Arch. Histol. Cytol.* 58: 103-115
- Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE. 2004. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer.* 101: 613-619
- Fadok VA, Henson PM. 1998. Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr. Biol.* 8: R693-695.
- Feder HH. 1971. The comparative actions of testosterone propionate and 5-androstan-17-ol-3-one propionate on the reproductive behaviour, physiology and morphology of male rats. *J. Endocrinol.* 51: 241-252.
- Fischer UG, Wood SH, Bruhn J, Roseff SJ, Mortola J, Rivier JE, Yen SSC. 1992. Effect of human corticotropin-releasing hormone on gonadotropin secretion in cycling and postmenopausal women. *Fertil. Steril.* 58: 1108-1112.
- Foidart A, Harada N, Balthazart J. 1995. Aromatase-immunoreactive cells are present in Mouse brain areas that are known to express high levels of aromatase activity. *Cell. Tissue. Res.* 280: 561-574.
- Fox TO, Baum MJ. 1987. Androgens and estrogens in the brain. *Encyclopedia of Neuroscience.* 1: 44-47
- Fraser A, Evan G. 1996. A license to kill. *Cell.* 85: 781-784.
- Fuxe K, Everit BJ, Hokfelt T. 1997. Enhancement of sexual behaviour in the female rat by nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 7: 147-151.
- Gaffey TA, Scheithauer BW, Lloyd RV, Burger PC, Robbins P, Fereidooni F, Horvath E, Kovacs K, Kuroki T, Young Jr. WF, Sebo TJ, Riehle DL, Belzberg AJ. 2002. Corticotroph carcinoma of the pituitary: a clinicopathological study. Report of four cases. *J. Neurosurg.* 96: 352-360

- Garcia MM, Kapcala LP. 1995. Growth of a microprolactinoma to a macroprolactinoma during estrogen therapy. *J. Endocrinol. Invest.* 18: 450-455.
- George FW, Ojeda SR. 1982. Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology.* 111: 522-529.
- Ghannam NN, Hammami MM, Muttair Z, Bakheet SM. 1999. Primary hypothyroidism-associated TSH-secreting pituitary adenoma/hyperplasia presenting as a bleeding nasal mass and extremely elevated TSH level. *J. Endocrinol. Invest.* 22: 419-423.
- Gold EB. 1981. Epidemiology of pituitary adenomas. *Epidemiol. Rev.* 3: 163-183.
- Goluboff LG, MacRae ME, Ezrin C, Sellers EA. 1970. Auto-radiography of tritiated thymidine labeled anterior pituitary cells in propylthiouracil treated rats. *Endocrinology.* 87: 1113-1118
- González MI, Leret ML. 1994. Injection of an aromatase inhibitor after the critical period of sexual differentiation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47: 183-186.
- Gooren LJ, Assies J, Asscheman H, de Slegte R, van Kessel H. 1988. Estrogen-induced prolactinoma in a man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 444-446.
- Gratzner HG. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 218: 474-475
- Gray`s. 2005. *Gray. Anatomía para estudiantes.* Drake RL, Volg W, Mitchell AWM. Eds. Elsevier.
- Green VL, White MC, Hipkin LJ, Jeffereys RV, Foy PM, Atkin SL. 1997. Apoptosis and p53 supressor gene protein expresión in human anterior pituitary adenomas. *Eur. J. Endocrinol.* 136: 382-387.
- Gutiérrez S, Petiti JP, De Paul AL, Mukdsi JH, Aoki A, Torres AI, Orgnero EM. 2005. Antagonic effects of oestradiol in interaction with IGF-I on proliferation of lactotroph cells in vitro. *Histochem. Cell. Biol.* 124: 291-301.
- Haggi ES, Torres AI, Maldonado CA, Aoki A. 1986. Regression of redundant lactotrophs in rat pituitary gland after cessation of lactation. *Endocrinology.* 111: 367-373

- Harada N. 1988. Cloning of a complete cDNA encoding human aromatase: immunochemical identification and sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156: 725-732.
- Harada N, Yamada K. 1992. Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid in mouse brain: fluorometrical quantitation by polymerase chain reaction. *Endocrinology.* 131: 2306-2312.
- Hardy J. 1980. ten years after the recognition of pituitary microadenomas; in Faglia G, Giovanelli MA, MacLeod RM. (eds). *Pituitary microadenomas.* New York, Academic Press. Pp. 7-14.
- Hashi A, Mazawa S, Chen S, Kato J, Arita J. 1995. Pentobarbital anesthesia during the proestrous afternoon blocks lactotroph proliferation occurring on estrus in female rats. *Endocrinology.* 136: 4665-4671.
- Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, Singson R, Melmed S. 1999. Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nat Med.* 5:1317-21
- Herlant M. 1964. The cells of the adenohipophysis and their functional significance. *Int. Rev. Cytol.* 17: 299-382.
- Hernández C. 2009. Expresión del coactivador de receptor estrogénico AIB1 en los prolactinomas humanos y su correlación con la expresión de aromatasa, receptor estrogénico y proteína p53. Tesis Doctoral de la Universidad de Salamanca.
- Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M. 1998. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature.* 393: 272-276.
- Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, Honda A, Imaizumi K, Tohyama M. 2004. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation caspase-3 via caspase-12. *Neurosci. Lett.* 357: 127-130.
- Hockenberry D, Núñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 348: 334-336.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC. 1994. Database of p53 gene so-

- matic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 3551-3555
- Horvath E, Scheitauer BW, Kovacs K, lloyd RV. 2002. Hypothalamus and pituitary. In Graham DI, Lantos PL. (eds). *Greenfield's Neuropathology*, Vol. 1, 7th ed. New York: Arnold Publishers. 983-1051.
- Horvath E. 1994. Ultrastructural markers in the pathologic diagnosis of pituitary adenomas. *Ultrastruct. Pathol.* 18: 171-179.
- Horvath E, Kovacs K. 1998. Three cases of a hitherto unrecognized pituitary tumour: it is caused by maternal exposure to unidentified factor(s) during pregnancy? *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 49: 547-548.
- Horvath E, Kovacs K. 2008. Pathology of tumors of the pituitary. En: *Clinical endocrine oncology*. Hay ID, Wass JAH, Eds. Blackwell Publishing.
- Houtsmuller EJ, Brand T, De Jonge FH, Joosten RNJM, Van Del Poll NE, Slob AK. 1994. SND-POA volume sexual behaviour and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. *Physiol Behav.* 56: 535-541.
- Hunt TE. 1943. Mitotic activity in the anterior hypophysis of female rats of different age groups and at different periods of the day. *Endocrinology.* 32: 334-339
- Hunt TE, Hunt EA. 1966. A radioautographic study of the proliferative activity of adrenocortical and hypophyseal cells of the rat at different periods of the estrous cycle. *Anat. Rec.* 156:361- 368
- Huppertz B, Frank HG., Kaufmann K. 1999. the apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat. Embryol. (Berl)*. 200: 1-18.
- Hurel SJ, Thompson CJ, Watson MJ, Baylis PH, Kendall-Taylor P. 1996. The short synacthen and insulin stress tests in the assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin. Endocrinol.* 44: 141-146.
- Hutchison JB, Beyer C, Hutchinson RE, Wozniak E. 1995. Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J. Steroid Biochem.* 53: 307-313.
- Hutchison JB, Steimer TH, Hutchison RE. 1991a. Area specific hormonal regulation of brain aromatase. *Brain. Res.* 50: 95-100.

- Hutchison RE, Hutchison JB, Steimer T, Steel E, Powers JB, Walker AP, Herbert J, Hastings MH. 1991b. Brain aromatization of testosterone in the male Syrian hamster: effects of androgen and photoperiod. *Neuroendocrinology*. 53: 194-203.
- Hutchison JB, Wozniak TH, Hutchinson RE. 1992. Regulation of female brain aromatase activity during the reproductive cycle of the dove. *J. Endocrinol.* 134: 385-396.
- Ishibashi M, Yamaji T. 1985. Mechanism of the inhibitory action of dopamine and somatostatin on prolactin secretion from human lactotrophs in culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 599-606.
- Ivanchuk SM, Rutka JT. 2004. The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints. *Neurosurgery*. 54: 692-9; discussion 699-700;
- Jackson RJ, Adnane J, Coppola D, Cantor A, Sebti SM, Pledger WJ. 2002. Loss of the cell cycle inhibitors p21 (Cip1) and p27 (Kip1) enhances tumorigenesis in knockout mouse models. *Oncogene*. 21: 8486-8487.
- Jaita G, Candolfi M, Zaldivar V, Zarate S, Ferrari L, Pisera D, Castro MG, Seilicovich A. 2005. Estrogens up-regulate the Fas/FasL apoptotic pathway in lactotrophs. *Endocrinology*. 146: 4737-4744.
- Jin L, Zhang S, Bayliss J, Scheithauer B, Qian X, Kobayashi I, Stridsberg M, Lloyd RV. 2003. Chromogranin a processing in human pituitary adenomas and carcinomas: analysis with region-specific antibodies. *Endocr. Pathol.* 14: 37-48
- Jones HB, Harbottle SJ, Bowdler AL. 1994. Assessment of the labeling index of cohorts of the anterior pituitary cell population in phenobarbital-treated male rats by a double immunohistochemical technique for bromodeoxyuridine and pituitary hormones. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 543-549
- Kalbermann LE, Szijan I, Burdman JA. 1979. Cell proliferation in the rat pituitary gland. A mechanism of control in prolactin cells. *Experientia*. 35: 689-690.
- Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, Buchfelder M, Grossman AB. 2005. CLINICAL REVIEW: Diagnosis and management of pituitary carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 90: 3089-3099.

- Kaltsas GA, Grossman AB. 1998. Malignant pituitary tumours. *Pituitary*. 1: 69-81
- Kaplan SA. 2007. The pituitary gland: a brief history. *Pituitary*. 10: 323-325.
- Kapranos N, Kontogeorgos G. 2000. Bcl-2 gene family in endocrine pathology: A review. *Endocr. Pathol.* 11: 205-213.
- Kerr IF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 26: 239-257
- Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275: 1132-1136
- Kontogeorgos G, Sambaziotis D, Piaditis G, Karameris A. 1997. Apoptosis in human pituitary adenomas: a morphologic and in situ end-labeling study. *Mod. Pathol.* 10: 921-926
- Kontogeorgos G. 2005. Classification and pathology of pituitary tumors. *Endocrine*. 28: 27-35.
- Kontogeorgos G. 2006. Predictive markers of pituitary adenoma behaviour. *Neuroendocrinology*. 83: 179-188
- Kontogeorgos G, Asa SL, Kovacs K, Smyth HS, Singer W. 1993. Production of α -subunit of glycoprotein hormones by pituitary somatotroph adenomas in vitro. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*. 129: 543-547.
- Korsmeyer SJ. 1992. Bcl-2: An antidote of programmed cell death. *Cancer Surv.* 15: 105-118.
- Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. 1997. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 277: 559-62.
- Kovacs K, Rotondo F, Stefanuanu L, Fereidooni F, Horvarth E, Lloyd RV. 2001. Glucocorticoid receptor expression in nontumorous human pituitaries and pituitary adenomas. *Endocr. Pathol.* 11: 267-275.
- Kovacs K, Horvath E. 1986. In: Tumors of the pituitary. Atlas of tumor pathology. Fascicle 21, 2nd series, Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC.

- Kovacs K, Horvath E. 2005. Effects of medical therapy on pituitary tumors. *Ultrastruct Pathol.* 29(3-4):163-7.
- Kovacs K, Stefaneanu L, Ezzat S, Smyth HS. 1994. Prolactin-producing pituitary adenoma in a male- to-female transsexual patient with protracted estrogen administration. A morphologic study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 118: 562-565.
- Kovacs K, Stefaneanu L, Horvath E, Lloyd RV, Lancranjan I, Buchfelder M, Fahlbusch R. 1991. Effect of dopamine agonist medication on prolactin producing pituitary adenomas. A morphological study including immunocytochemistry, electron microscopy and in situ hybridization. *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 418: 439-46.
- Krammer PH. 1998. The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system (review). *Toxicol Lett.* 102-103: 131-137.
- Krammer PH. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795.
- Krey LC, Maclusky NJ, Davis PG, Lieberburg DI, Roy EJ. 1982. Different intracellular mechanisms underlie testosterone's suppression of basal and stimulation of cyclic luteinizing hormone release in male and female rats. *Endocrinology.* 110: 2159-2167.
- Kulig E, Jin L, Quian X, Horvath E, Kovacs K, Stefaneanu L, Scheithauer BW, Lloid RV. 1999. Apoptosis in nontumorous and neoplastic human pituitarias. Expression of the Bcl-2 Family of proteins. *Am. J. Pathol.* 154: 767-774
- Kumar S, Lavin MF. 1996. The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell. Death. Differ.* 3: 255-67.
- Kurki P, Ogata K, Tan EM. 1988. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 109: 49-59.
- Kurosumi K. 1971. Mitosis of the rat anterior pituitary cells: an electron microscope study. *Arch. Histol. Jpn.* 33: 145-160.
- Kurosumi K. 1979. Formation and release of secretory granules during mitosis in the anterior pituitary gland. *Arch. Histol. Jpn.* 42: 481-6.

- Kurosumi K, Kobayashi Y. 1966. Corticotrophs in the anterior pituitary glands of normal and adrenalectomized rats as revealed by electron microscopy. *Endocrinology*. 78: 745-58.
- Labrie F, Belanger A, Luu-The V, Labrie C, Simona J, Cusan L, Gómez JL, Candas B. 1998. DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids*. 63: 322-328.
- Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW. 1994. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum associated Ca⁺⁺ fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 6569-6573.
- Landberg G, Roos G. 1991. Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer. Res*. 51: 4570-4574
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest*. 115: 2665-2672.
- Leblond CP, Walker BE. 1956. Renewal of cell populations . *Physiol. Rev*. 36: 255-276.
- Lee EJ, Duan WR, Jakacka M, Gehm BD, Jameson JL. 2001. Dominant negative ER induces apoptosis in GH(4) pituitary lactotrope cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Endocrinology*. 142: 3756-3763.
- Lephart ED, Simpson ER, McPhaul MJ, Kilgore MW, Wilson JD, Ojeda SR. 1992a. Brain aromatase cytochrome P-450 messenger RNA levels and enzyme activity during prenatal and perinatal development in the rat. *Mol. Brain. Res*. 16: 187-192.
- Lephart ED, Simpson ER, Ojeda SR. 1992b. Effects of cyclic AMP and androgens on in vitro brain aromatase enzyme activity during prenatal development in the rat. *J. Neuroendocrinol*. 4: 29-35.
- Levy A, Lightman S. 2003. Molecular defects in the pathogenesis of pituitary tumours. *Front. Neuroendocrinol*. 24: 94-127.
- Lewin B. 2000. *Genes*. Oxford, McGraw-Hill, 5 ed. 2850-2912.
- Lichnovsky V, Erdosova B, Punkt K, Zapletal M. 1999. Expresión of bcl-2 expression in the developing kidney of human embryos and fetusea qualitative and quantitative study. *Acta. Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med*. 142: 61-64

- Lloyd HM, Meares JD, Jacobi J. 1975. Effects of oestrogen and bromocryptine on in vivo secretion and mitosis in prolactin cells. *Nature*. 255: 497-498
- Lloyd RV, Kovacs K, Young Jr. WF, Farrel WE, Asa SL, Truillas J, Kontogeorgos G, Sano T, Scheithauer BW, Horvath E, DeLellis RA, Heitz PU. 2004. Pituitary tumors. In: DeLellis R, Lloyd RV, Heitz PV, Eng C, eds. Introduction. WHO classification of tumors of the endocrine organs: pathology and genetics of endocrine organs. Lyon: IARC Press; 10-13
- Lloyd RV, Chandler WF, Mckeever PE., Schteingart DE. 1986. The spectrum of ACTH-producing pituitary lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* 10: 618-626.
- Losa M, Schopohl J, Müller OA, von Werder K. 1985. Growth hormone releasing factor induces prolactin secretion in acromegalic patients but not in normal subjects. *Acta. Endocrinol. (Copenh).* 109: 467-473.
- Losa M, Barzaghi RL, Mortini P, Franzin A, Mangili F, Tereni MR, Giovanelli M. 2000. Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors: Comparison between micro- and macroadenomas. *Am. J. Pathol.* 156: 245-251.
- Luciano AA, Sherman BM, Chapler FK, Hauser KS, Wallace RB. 1985. Hyperprolactinemia and contraception: a prospective study. *Obstet. Gynecol.* 65: 506-511.
- Lundberg AS, Weinberg RA. 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer.* 35: 531-539.
- Luttge WG. 1975. Effects of anti-estrogens on testosterone stimulated male sexual behavior and peripheral target tissues in the castrated male rat. *Physiol. Behav.* 14: 839-846.
- MacLeod RM, Scapagnini U, Thorner MO. 1980. Pituitary microadenomas. New York, Academic Press. Pp. 683-855.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. 1998. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signalling. *J. Cell. Biol.* 140: 1485-1495.
- Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. 2003. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signalling. *J. Biol. Chem.* 278: 9100-9106.

- Marks N, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. 1998. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 52: 334-341.
- Martin SJ, Green DR. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell.* 82: 349-352.
- Martini L. 1982. The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures: biochemical and physiological implications. *Endocr. Rev.* 3: 1-25
- Mastro A, Shelton E, Hymer WC. 1969. DNA synthesis in the rat anterior pituitary. *J. Cell. Biol.* 43: 626-629
- McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI. 1997. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage or the Bcl-2 homologur Bak. *J. Cell. Biol.* 136: 215-227.
- McCarthy MM. 1994. Molecular aspects of sexual iferentiation of the roent brain. *Psychoneuroendocrinol.* 19: 415-427
- McDonald PG, Beyer C, Newton F, Brien B, Baker R, Tan HS, Sampson C, Kitching P, Greenhill R, Pritchard D. 1970. Failure of 5 α -dihydrotestosterone to initiate sexual behaviour in the castrated male rat. *Nature.* 227: 964-965.
- McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. 1991. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349: 254-256.
- McGregor A, Herbert J. 1992. Specific effects of β -endorphin infused into the amygdale on sexual behaviour in the male rat. *Neuroscience.* 46: 165-172.
- Melmed S. 2003; Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J. Clin. Invest.* 112: 1603-1618. Review.
- Michael RP, Bonsall RW, Rees HD. 1987. Sites at which testosterone may act as an estrogen in the brain of the male primate. *Neuroendocrinology.* 46: 511-521.
- Michael RP, Bonsall RW, Rees HD. 1989. The uptake of [3H] testosterone and its metabolites bny the brain and pituitary gland of the fetal macaque. *Endocrinology.* 124: 1319-1326.

- Michnovicz JJ, Hahn EF, Fishman J. 1987. 19-Hydroxylation and aromatization of androgens in the developing rat brain. *Endocrinology*. 121: 1209-1214.
- Mignotte B, Vayssiere JL. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem*. 252: 1-15.
- Missale C, Russel Nash S, Robinson S, Jaber M, Caron M. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev*. 78: 189-225.
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. 1978. Antibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. immunol*. 121: 2228.
- Montero MC, Vázquez R, Rubio M, Blanco E, Riesco JM, Herrero JJ, Vázquez G, Riesco-López JM, González R, Carretro M, Basco M, Carretero J. 2006. Apoptosis is involved in the anti-proliferative effect of corticosterone in non tumoral ACTH pituitary cells. *Eur. J. Anat*. 10: 143-149.
- Moore KL, Dalley AF. 2007. Anatomía con orientación clínica. Editorial medica Panamericana. Lippincott. William & Wilkins.
- Morali G, Larsson K, Beyer C. 1977. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Horm. Behav*. 9: 203-213.
- Morris JF. 2008. Structure and development of the endocrine system. En: *Clinical endocrine oncology*. Hay ID, Wass JAH. Eds. Blackwell Publishing.
- Mountcastle RB, Roof BS, Mayfield RK, Mordes DB, Sagel J, Biggs PI, Rawe SE. 1989. Pituitary adenocarcinoma in an acromegalic patient: response to bromocriptine and pituitary testing: a review of the literature on 36 cases of pituitary carcinoma. *Am. J. Med. Sci*. 298: 109-118
- Musgrove EA, Davison EA, Ormandy CJ. 2004. Role of the CDK inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: insights from knockout mice. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia*. 9: 55-66. Review.
- Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M, White RJ, Takaoka Y, Wolin L. 1974. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent. Prog. Horm. Res*. 31: 295-319.
- Naftolin F, Horvath TL, Jakab RL, Leranath C, Harada N, Balthazart J. 1996. Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate Brain. *Neuroendocrinology*. 63: 149-155.

- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365.
- Nakajima T, Kagawa K, Deguchi T, Hikita H, Okanoue T, Kashima K, Konishi E, Ashihara T. 1994. Biological role of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression during rat liver regeneration. *Acta. Histochem. Cytochem.* 27: 135-140
- Nakane PK, Moriuchi T, Koji T, Taniguchi Y, Izumi S, Hui L. 1989. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin): review and some new findings. *Acta Histochem.* 22: 105-116.
- Nebert DW, González FJ. 1987. P450 genes: structure, evolution and regulation. *A Rev. Biochem.* 56: 945-953.
- Negri Cesi P, Melcangi RC, Celotti F, Martini L. 1992. Aromatase activity in cultured brain cells: difference between neurons and glia. *Brain. Res.* 589 : 327-332.
- Nelson DR, Koimans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 6: 1-42.
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. 2003. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 112: 481-490
- Nicholson DW. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell. Death. Differ.* 6: 1028-1042.
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends. Biochem. Sci.* 22: 299-306. Review.
- Nolan LA, Kavanagh E, Lightman SL, Levy A. 1998. Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. *J. Neuroendocrinol.* 10: 207-215.
- Nose-Alberti V, Mesquita MI, Martin LC, Kayath MJ. 1998. Adrenocorticotropin-producing pituitary carcinoma with expression of c-erbB-2 and high PCNA index: a comparative study with pituitary adenomas and normal pituitary tissues. *Endocr. Pathol.* 9: 53-62
- Nouët JC, Kujas M. 1975. Variations of mitotic activity in the adenohipophysis of male rats during a 24-hour cycle. *Cell. Tissue. Res.* 164: 193-200

- Ogata K, Ogata Y, Nakamura RN, Tan EM. 1985. Purification and N-terminal amino acid sequence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cycling and development of ELISA for anti-PCNA antibodies. *J. Immunol.* 135: 2623.
- Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T, Morii S. 1993. Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: Influences of sex estrous cycle and circadian change. *Anat. Rec.* 235: 111-120
- Oomizu S, Chaturvedi K, Sarkar DK. 2004. Folliculostellate cells determine the susceptibility of lactotropes to estradiol's mitogenic action. *Endocrinology.* 145: 1473-1480.
- Ozawa A, Yamada M, Satoh T, Monden T, Hashimoto K, Kohga H, Hashiba Y, Sasaki T, Mori M. 2002. Transcriptional regulation of the human PRL-releasing peptide (PrRP) receptor gene by a dopamine 2 receptor agonist: Cloning and characterization of the human PrRP receptor gene and its promoter region. *Mol. Endocrinol.* 16: 785-798.
- Ozer E, Canda MS, Ulukus C, Garay M, Erbayraktar S. 2003. Expresión of bcl-2, bax and p53 proteins in pituitary adenomas: an immunohistochemical study. *Tumori.* 89: 54-59.
- Pattacini L, Mancini M, Mazzacurati L, Brusa G, Benvenuti M, Martinelli G, Baccarani M, Santucci MA. 2004. Endoplasmic reticulum stress initiates apoptotic death induced by STI571 inhibition of p210 bcr-abl tyrosine kinase. *Leuk. Res.* 28: 191-202.
- Pernicone PI, Scheithauer BW, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvarth E, Young Jr. WF, Lloyd RV, Davis DH, Guthrie BL, Schoene WC. 1997. Pituitary carcinoma: a clinicopathologic study of 15 cases. *Cancer.* 79: 804-812
- Pisera D, Candolfi M, Navarra S, Ferraris J, Zaldivar V, Jaita G, Castro MG, Seilicovich A. 2004. Estrogens sensitize anterior pituitary gland to apoptosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: 767-771.
- Plumpton FS, Besser GM. 1969. The adrenocortical response to surgery and insulin-induced hypoglycaemia in corticosteroid-treated and normal subjects. *Br. J. Surg.* 56: 216-219.
- Pomerat GR. 1941. Mitotic activity in the pituitary of the white rat following castration. *Am. J. Anat.* 69: 89-121

- Porter TD. 1991. An unusual yet strongly conserved flavoprotein in bacteria and mammals. *Trends. Biochem. Sci.* 16: 154-158.
- Prezant TR, Melmed S. 2002. Molecular pathogenesis of pituitary disorders. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes.* 9: 61-78.
- Radl DB, Zárate DB, Jaita G, Ferraris J, Zaldivar V, Eijo G, Seilicovich A, Pissera D. 2008. Apoptosis of lactotrophs induced by D2 receptor activation is estrogen dependent. *Neuroendocrinology.* 88: 43-52.
- Raff MC. 1996. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell.* 86: 173-175.
- Ragel BT, Couldwell WT. 2004. Pituitary carcinoma: a review of the literature. *Neurosurg. Focus.* 16: E7
- Reed JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* 124: 1-6
- Renehan AG. 2008. Hormones, growth factors and tumor growth. En: *Clinical endocrine oncology.* Hay ID, Wass JAH. Eds. Blackwell Publishing.
- Renvoize C, Roger R, Moulian N, Bertoglio J, Breard J. 1997. Bcl-2 expression in target cells lead to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK and lymphokine-activated killer cell granule-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 159: 126-143.
- Riddle O. 1933. The preparation, identification, and assay of prolactin. *Amer. J. Physiol.* 105: 191-216.
- Rioh DM, Wislocki GB, O'Leary JL. 1940. A precis of preoptic hypothalamic and hypophyseal terminology with atlas. En: *The Hypothalamus.* pp. 3-30. (Fulton JF. Ranson SW. Franz AM. Eds.) Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 3-30.
- Roncaroli F, Scheithauer BW, Young WF, Horvath E, Kovacs K, Kros JM, Al Sarraj S, Lloyd RV, Faustini-Fustini M. 2003. Silent corticotroph carcinoma of the adenohypophysis: a report of five cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 27: 477-486
- Roselli CE, Salisbury RL, Resko JA. 1987. Genetic evidence for androgen-dependent and independent control of aromatase activity in the rat brain. *Endocrinology.* 121: 2205-2210

- Roselli CE. 1991. Sex differences in androgen receptors and aromatase activity in microdissected regions of the rat brain. *Endocrinology*. 128: 1310-1316.
- Roselli CE, Ellinwood WN, Resko JA. 1984. Regulation of brain aromatase activity in rats. *Endocrinology*. 114: 192-200.
- Roselli CE, Horton LE, Resko JA. 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology*. 117: 2471-2477.
- Sachs BD, Meisel RL. 1989. En: *The physiology of reproduction* (Knobil, Neill, Ewing, Greenwald, Market, Pfaff, Eds.). Raven Press. New. York. 1393-1485.
- Sadoul JL, Thyss A, Freychet P. 1992. Invasive mixed growth hormone/prolactin secreting pituitary tumour: complete shrinking by octreotide and bromocriptine, and lack of tumour growth relapse 20 months after octreotide withdrawal. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*. 126: 179-183.
- Saitoh Y, Arita N, Ohnishi T, Ekramullah S, Takemura K, Hayakawa T. 1997. Absence of apoptosis in somatotropinomas treated with octreotide. *Acta Neurochir*. 139: 851-856
- Sakuma S, Shirasawa N, Yoshimura F. 1984. A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adnohypophysial cells in immature and mature castrated rats. *J. Endocrinol*. 100: 323-328
- Samali A, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. 1998. Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. *FEBS Lett*. 431: 167-169.
- Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. 2003. Pituitary. Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas. 6: 127-133.
- Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED. 1991. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology*. 129: 2834-2844.
- Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. 1990. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*. 127: 3180-3186

- Sar M, Stumpf WE. 1975. Distribution of androgenconcentrating neurons in rat brain. En: Anatomical neuroendocrinology. (Stumpf WE, Grmt LD. Eds.) Karger New York. pp: 120-133.
- Sarkar DK. 2006. Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals. *Front. Horm. Res.* 35: 32-49. Review.
- Sarkar DK, Chaturvedi K, Oomizu S, Boyadjieva NI, Chen CP. 2005. Dopamine, dopamine D2 receptor short isoform, transforming growth factor (TGF)- β 1. and TGF- β type II receptor interact to inhibit the growth of pituitary lactotropes. *Endocrinology.* 146: 4179- 4188.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. 1982. Damage to hypothalamic dopaminergic neuron is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science.* 218: 684-686.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. 1983. Relation of the neuroendocrine system to development of prolactin secretion pituitary tumors; in Meites J (ed): *Neuroendocrinology of Aging.* New York, Plenum Press, pp 353-376.
- Scheithauer BW, Fereidooni F, Horwat E, Kovacs K, Robbins P, Tews D, Henry K, Pernicone P, Gaffrey Jr, TA. Meyer FB, Young Jr. WF, Fahlbusch R, Buchfelder M, Lloyd RV. 2001. Pituitary carcinoma: an ultrastructural study of eleven cases. *Ultrastruct. Pathol.* 25: 227-242.
- Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Yapicier O, Young WF Jr, Meyer FB, Kuroki T, Riehle DL, Laws ER Jr. 2006. Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery.* 59: 341-353. Discussion.
- Schonemann A. 1892. hypophysis und thyreoidea. *Virchow. Arch.* 216: 443-452.
- Schuff KG, Hentges ST, Kelly MA, Binart N, Kelly FA, Iuvone PM, Asa SL, Low MJ. 2002. Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 110:973-981.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA. 1993. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 14: 133-151.

- Segovia S, Guillamón A. 1993. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 18: 51-74. Review.
- Selmanoff MK, Brodtkin LD, Weiner RI, Siiteri PK. 1977. Aromatization and 5α -reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. *Endocrinology.* 101: 841-848.
- Senovilla L, Núñez L, de Campos JM, de Luis DA, Romero E, Sánchez A, García-Sancho J, Villalobos C. 2004. Multifunctional cells in human pituitary adenomas: implications for paradoxical secretion and tumorigenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 4545-4552.
- Sharma AK, Rohrer B. 2004. Calcium-induced calpain mediates apoptosis via caspase-3 in a mouse photoreceptor cell line. *J. Biol. Chem.* 279:35564-35572.
- Shinoda K, Vagi H, Fujita H, Osawa V, Shiotani V. 1989b. Screening of aromatase-containing neurons in rat forebrain; an immunohistochemical study with antibody against human placental antigen X-P2 (hPAX-P2). *J. Comp. Neurol.* 290: 502-515
- Shinoda K, Vagi H, Osawa V, Shiotani V. 1990. Involvement of specific placental antigen X-P2 in rat olfaction; an immunohistochemical study in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 294: 340-344.
- Shirasawa N, Yoshimura F. 1982. Immunohistochemical and electron microscopical studies of mitotic adenohipophysial cells in different ages of rats. *Anat. Embryol.* 165: 51-61
- Shivers BD, Harlan RE, Pfaff DW. 1989. A subset of neurons containing immunoreactive prolactin is a target for estrogen regulation of gene expression in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 49: 23-7.
- Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS. 2006. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr. Pharm. Des.* 12:2249-2270. Review.
- Shull JD, Spady TJ, Snyder MC, Johansson SL, Pennington KL. 1997. Ovary-intact, but not ovariectomized female ACI rats treated with 17β -estradiol rapidly develop mammary carcinoma. *Carcinogenesis.* 18: 1595-1601.

- Shy KK, McTiernan AM, Daling JR, Weiss NS. 1983. Oral contraceptives use and the occurrence of pituitary prolactinoma. *J. Am. Med. Assoc.* 249: 2204-2207.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR. 1994. Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine reviews.* 15: 342-355
- Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ, Russell JT. 2000. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32: 35-46. Review.
- Spada A, Mantovani G, Lania A. 2005. Pathogenesis of prolactinomas. *Pituitary.* 8: 7-15.
- Spada A, Vallar L. 1992. G-protein oncogenes in acromegaly. *Horm Res.* 38: 90-3. Review.
- Srikant CB. 1995. Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201-995 in AtT -20 mouse pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209: 400-406
- Städtler F, Stöcker E, Dhom G, Tietze HU. 1970. Autoradiographic studies on nuclear DNA and RNA synthesis in the adenohypophysis of castrated rats. *Acta. Endocrinol.* 64: 324-338
- Steel E, Hutchison JB. 1988. Behavioral action of estrogen in male hamsters: Effect of the aromatase inhibitor, 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD). *Horm. Behav.* 22: 252-265.
- Stefaneanu L, Kovacs K, Lloyd RV, Scheithauer BW, Young WF, Sano T, Jin L. 1992. Pituitary lactotrophs and somatotrophs in pregnancy: a correlative in situ hybridization and immunocytochemical study. *Virchows Arch. Pathol.* 62: 291-296
- Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Lloyd R, Buchfelder M, Fahlbusch R, Smyth H. 1994. In situ hybridization study of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human adenohypophysial cells and pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 83-88.
- Steimer TH, Hutchison JB. 1981. Androgen increases formation of behaviourally effective oestrogen in the dove brain. *Nature.* 292: 345-347.

- Storch A, Ludolph AC, Schwarz J. 2004. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J. Neural. Transm.* 111: 1267-1286.
- Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. 1990. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature.* 348: 331-333.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. 2000. Apoptosis Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 217-245.
- Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, Harris AW. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8661- 8665
- Stumpf WE, Sar M, Keefer DA. 1975. Atlas of estrogen target cells in rat brain. En: *Anatomical Neuroendocrinology.* (Stumpf WE. Grant LD. Eds.). Karger, Basel. pp: 104-119.
- Suhardja A, Kovacs K, Rutka J. 2001. Genetic basis of pituitary adenoma invasiveness: a review. *J. Neurooncol.* 52: 195-204 .
- Sulston JE, Horvitz HR. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans.* *Dev. Biol.* 56:110-156.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzani N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold R, Siderovski DP, Penninger JM, JKroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397: 441-6.
- Suzuki H, Noguchi K, Nakahata M, Nakagawa S, Cadena N. 2005. Effect of iopanoic acid on the pituitary-thyroid axis: time sequence of changes in serum iodothyronines, thyrotropin, and prolactin concentrations and responses to thyroid hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53: 779-83.
- Takahashi S, Kawashima S. 1987. Proliferation of prolactin cells in the rat: effects of strogen and bromocriptine. *Zool. Sci.* 4: 855-860.
- Takahashi S. 1995. Development and heterogeneity of prolactin cells. *Int. Rev. Cytol.* 157: 33-98.
- Takahashi S, Okazaki K, Kawashima S. 1984. Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. *Cell. Tissue. Res.* 235: 497-502.

- Takahashi S. 2004. Intrapituitary regulatory system of proliferation of mammothrophs in the pituitary gland. *Zoolg. Sci.* 21: 601-611.
- Takasaki Y, Fishwild D, Tan EM. 1984a. Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J. Exp. Med.* 159: 981.
- Taniguchi Y, Yasutaka S, Kominami R, Shinohara H. 2001. Proliferation and differentiation of thyrotrophs in the pars distalis of the rat pituitary gland during late fetal and postnatal period. *Anat. Embryol.* 204: 469-475.
- Taylor WA, Uttley D, Wilkins PR. 1994. Multiple dural metastases from a pituitary adenoma. Case report. *J. Neurosurg.* 81: 624-626
- Testut L, Latarjet A. 1969. Hipófisis. En: *Tratado de Anatomía Humana*. Tomo III. Salvat Eds.
- Thompson EB. 1994. Apoptosis and steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 8: 665-673.
- Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
- Thornberry NA, Lazaenik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science.* 281: 1312-1316. Review.
- Tsuruo Y, Ishimura K, Fujita H, Osawa Y. 1994. Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the rat brain during pre- and postnatal development. *Cell. Tissue Res.* 278: 29-39
- Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. 2003. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr. Rev.* 24: 600-632
- Vance ML. 2003. Medical treatment of functional pituitary tumors. *Ultrastruct. Pathol.* 14: 81-87.
- Vander Heyden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. 1997. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell.* 91: 627-637.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: From structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52: 269-324.
- Vaux DL, Strasser A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 2239-2244. Review.

- Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 335: 440-442.
- Vázquez Perfecto G. 1997. Estudio ontogenico de la Aromatasa P450 en la hipofisis de la rata y su modulacion postnatal ejercida por los esteroides gonadales y la GNRH. Tesis Doctoral en Medicina. Universidad de Salamanca.
- Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. 2004. Phenotypic Characterization of multi-functional somatotropes, mamotropes and gonadotropes of the Mouse anterior pituitary. *Pflugers. Arch.* 449: 257-269.
- Visser-Wisselaar HA, Van Uffelen CJ, Van Koetsveld PM, Lichtenauer-Kaligis EG, Waaijers AM, Uitterlinden P, Mooy DM, Lamberts SW, Hofland LJ, 1997. 17- β -Estradiol-dependent regulation of somatostatin receptor subtype expression in the 7315b prolactin secreting rat pituitary tumor in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 138: 1180-1189.
- Vogt C. 1842. Untersuchungen uber die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkrote (*Alytes obstetricians*), ed. JU Gassman. pp. 130
- Wang DG, Johnston CF, Atkinson AB, Heaney AP, Mirakhur M, Buchanan KD. 1996. Expression of bcl-2 oncoprotein in pituitary tumours: comparison with c-myc. *J. Clin. Pathol.* 49: 795-797.
- Watanabe YG, Carbajo-Pérez E. 1990. Cell proliferation in pituitary monolayers as revealed by the BrdU labelling method. *Biomed. Res.* 11: 373-377.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NO, Jenkins NA, Nagata S. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 356: 314-317
- Weissig V, Cheng SM, D'Souza GG. 2004. Mitochondrial pharmaceuticals. *Mitochondrion*. 3: 229-244.
- Whalen RE, Luttge WG. 1971. Differential localization of progesterone uptake in brain. Role of sex, estrogen pretreatment and adrenalectomy. *Brain. Res.* 33: 147-155.
- Wicklund JA, Wertz N, Gorski J. 1981. A comparison of estrogen effect on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F-344 and Holtzman rats. *Endocrinology*. 109: 1700-1707.

- Wilson DF. 1982. Pituitary carcinoma occurring as middle ear tumor. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 90: 665-666
- Wingrave SJ, Kay CR, Vessey MP. 1980. Oral contraceptives and pituitary adenomas. *Br. Med. J.* 280: 685-686.
- Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306
- Yang E, Korsmeyer SJ. 1996. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood.* 88: 386-401
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 275: 1129-1136.
- Yin D, Kondo S, Takeuchi J, Morimura T. 1994. Induction of apoptosis in murine ACTH-secreting pituitary adenoma cells by bromocriptine. *FEBS. Lett.* 339: 73-75
- Yin P, Arita J. 2000. Differential regulation of prolactin release and lactotrope proliferation during pregnancy, lactation and the estrous cycle. *Neuroendocrinology.* 72: 72-79.
- Yin P, Arita J. 2002. Proestrus surge of gonadotropin-releasing hormone secretion inhibits apoptosis of anterior pituitary cells in cycling female rats. *Neuroendocrinology.* 76: 272-282.
- Zahedi A, Booth GL, Smyth HS, Farrell WE, Clayton RN, Asa SL, Ezzat S. 2001. Distinct clonal composition of primary and melanocytic adrenocorticotrophic hormone-producing pituitary carcinoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 55: 549-556
- Zong WX, Li G, Hatzivassiliou T, Lindsten QC, Yu J, Yuan CB, Thompson CB. 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell. Biol.* 1: 59-69.